

Suolistomikrobien erittämät vesikkelit lasten reumaa sairastavilla ja terveillä verrokeilla

Sini Julkunen

Pro gradu -tutkielma

Oulun yliopisto

Biologian tutkinto-ohjelma

Kesäkuu 2021

Ohjaajat: Justus Reunanen &
Lumi Viljakainen

1. Tiivistelmä

Kaikki solut, myös mikrobisolut, erittävät kaksoiskalvollisia nestepitoisia vesikkeleitä. Vesikkelit ovat solujen yksi tapa kommunikoida ja niillä uskotaan olevan merkitystä sairaustilojen, esimerkiksi lasten reuman (Juveniili idiopaattinen artriitti, JIA), kehittämisessä. Sairaana ja terveen ihmisen mikrobisto voi erota, jolloin myös mikrobiperäiset vesikkelit muuttuvat. Suolistomikrobiperäisiä vesikkeleitä voidaan eristää muun muassa ulosteesta. Eristetyistä vesikkeleistä voidaan tutkia niiden kokojakaumaa ja sisältöä, esimerkiksi proteiini ja nukleiinihappokoostumusta. Vesikkelin sisällöstä saadaan tietoa solusta, josta se on peräisin ja sisältö voi olla erilaista terveillä ja sairailta. Tällöin voidaan myös saada tietoa suoliston mikrobifloorasta. Mikrobit vaikuttavat erityisesti autoimmuunisairauksien kehittymiseen ja sairausmekanismien tunteminen on tärkeää, jotta sairauksia voidaan ennaltaehkäistä ja hoitaa. Vesikkeleitä voitaisiin mahdollisesti hyödyntää sairauksien diagnosoimisessa ja hoitamisessa, jos niitä opittaisiin eristämään ja analysoimaan tehokkaasti.

Sisällys

1. Tiivistelmä	1
2. Johdanto	3
2.1 Solujen erittämät vesikkelit	4
2.2 Autoimmuunisairaudet ja mikrobien vaikutus	6
2.3 Juveniili artriitti	9
3. Menetelmät	11
3.1 Näytteiden suodattaminen	11
3.2 Näytteiden konsentrointi	12
3.3 Vesikkeleiden eristys	12
3.4 Vesikkeleiden puhdistaminen	13
3.5 Näytteiden kuvaaminen	14
3.6 Proteiinien eristys	15
3.7 Tulosten käsittely	16
4. Tulokset	17
5. Johtopäätökset	31
6. Kiitokset	33
7. Viitteet	33

2. Johdanto

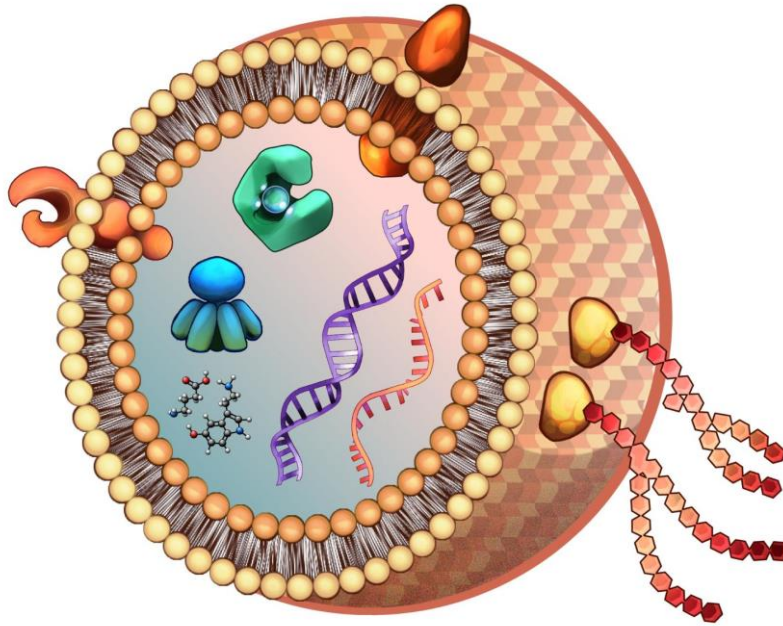
Kasvava tietomäärä on osoittanut, että ihmisen mikrobiomilla on yhteys moniin terveydellisiin ongelmiin ja mikrobiomi on välttämätön terveydelle. Mikrobiomilla tarkoitetaan mikrobien muodostamaa yhteisöä ja niiden geenejä, jossakin ympäristössä. Mikrobiomilla tarkoitetaan kaikkia tietyssä ympäristössä eläviä mikrobeja ja niiden geenejä. Ihmisen mikrobiomilla vastaavasti tarkoitetaan kaikkia niitä mikrobeja, jotka elävät ihmisen kehossa. Mikrobit ovat välttämättömiä elimistön normaalille toiminnalle, mutta ne voivat myös uhata terveyttä. Ei tiedetä millainen mikrobiomi olisi terveydellisesti edullisin, kuinka se kehittyy ja onko poikkeavat bakteerikannat syy vai seuraus erilaisista sairaustiloista. Tiedetään, että useissa merkittävässä kansantaudeissa bakteerikanta on muuttunut. Esimerkiksi lapsilla, joiden mikrobisto on kehittynyt puutteellisesti, on yhdessä geneettisen alttiuden kanssa kohonnut riski sairastua astmaan ja allergioihin (Kauffmann & Demenais, 2012). Viitteitä vastaavasta vaikutuksesta useisiin muihin sairauksiin on olemassa, erityisen suuri merkitys mikrobistolla lienee autoimmuunisairauksiin eli sairauksiin, joissa elimistö hyökkää virheellisesti omia kudoksia vastaan (Macia ym., 2020). Ilmiö liittyy länsimaalaiseen korkeaan hygieniatasoon ja puhutaankin hygieniahypoteesista.

Elimistön mikrobikoostumuksen perusteellinen selvittäminen perinteisesti esimerkiksi 3bakteeriviljelmillä ei onnistu, koska kaikkia bakteereita ei saada kasvamaan elimistön ulkopuolella. Lukuisien erilaisten solujen on huomattu erittävän ulkopuolelleen vesikkeleitä, jotka ovat eräänlaisia ”nestettä sisältäviä kaksoiskalvopusseja” ja sisältävät useita erilaisia molekyylejä, jotka voivat vaikuttaa muiden solujen toimintaan. Vesikkelin pintarakenteen ja sisällön perusteella saadaan tietoa solusta. Esimerkiksi syöpäsolut erittävät runsaasti poikkeavia vesikkeleitä. Tiedetään myös, että bakteeri- ja sienisolut erittävät omanlaisiaan vesikkeleitä, joilla ne voivat vaikuttaa isäntänsä elimistön toimintaan itselleen suotuisasti ja vesikkelin erittäneet solut voidaan tunnistaa vesikkelin sisältäminen nukleinihappojen perusteella ja vesikkelin proteiinien perusteella voidaan päätellä sen vaikutusta, esimerkiksi oletetaan, että sairaustiloissa proteiinikoostumus on erilainen (Macia ym., 2020).

2.1 Solujen erittämät vesikkelit

Kaikki solut erittävät ulkopuolelleen kalvon ympäröimiä vesikkeleitä, jotka sisältävät muun muassa proteiineja, lipidejä RNA:ta ja DNA:ta (Kim ym., 2015). Erilaisista soluista peräisin olevia vesikkelit on löydetty useita, esimerkiksi syljestä, verestä ja virtsasta, mutta on myös vesikkeleitä joiden tarkkaa alkuperää ei tunneta. Vesikkelit ovat tyypillisesti halkaisijaltaan 20–500 nm. Vesikkeliä ympäröi solukalvoa muistuttava fosfolipidikalvo, jonka rakenne riippuu lähtösolun solukalvon koostumuksesta. Tätä tietoa voidaan hyödyntää tunnistettaessa vesikkeleiden alkuperää. Vesikkelit voidaan luokitella esimerkiksi eritystavan, koon tai niiden kuljettaman sisällön mukaan. Ensimmäiset vesikkelihavainnot on tehty eläinsolujen tutkimuksen yhteydessä ja sittemmin niitä on löydetty myös bakteereilta ja sieniltä (Kim ym., 2015). Aluksi ajateltiin, että soluseinä estäisi vesikkeleiden erittymisen muun muassa kasveilla ja gram-positiivisilla bakteereilla. Varsin uusi havainto on, että myös gram-positiiviset bakteerit erittävät vesikkeleitä, mutta tapa, jolla ne eritetään ulos solusta, on epäselvä (Kim ym., 2015).

Koska vesikkeleitä esiintyy elimistössä runsaasti ja vesikkelit sisältävät paljon erilaisia viestintä- ja säätelytekijöitä, on perusteltua olettaa, että niillä on olennainen tehtävä solujen välisessä viestinnässä. Solujen välinen viestintä on välttämätöntä monisoluisen elion toiminnalle. On osoitettu, että vesikkelit pääsevät lähes kaikkialle elimistössä mikä herättää kiinnostusta, koska esimerkiksi aivoverieste läpäisee aineita erittäin huonosti, mutta vesikkelit voivat läpäistä sen. Vesikkelit voivat olla yksi tapa, jolla elimistön omat solut kommunikoivat, mutta myös suoliston mikrobien erittämät vesikkelit voivat vaikuttaa elimistön soluihin. Vesikkeleiden avulla mikrobit kommunikoivat keskenään ja ne voivat esimerkiksi haitata kilpailijan kasvua (Kim ym., 2015). Mikrobiperäiset vesikkelit ja niiden sisältämät säätelytekijät voivat vaikuttaa elimistön puolustusjärjestelmän kehittymiseen. Toisaalta vesikkeleiden proteiinikoostumus voi kertoa ravinnosta ja suoliston tilasta, koska useat proteiinit liittyvät esimerkiksi tiettyjen aineiden aineenvaihduntaan.



Kuva 1. Kuva havainnollista tyypillistä vesikkelistä. Vesikkelistä ympäröi fosfolipidikalvo, jossa on kiinnittyneenä erilaisia pintamolekyylejä lähtösolusta. Vesikkelin sisällä on DNA:ta, RNA:ta, proteiineja ja muita pieniä molekyylejä. Kuva © Sonja Salmi. Kuvan käyttöön on tekijän lupa.

Vesikkelit ovat suuren kiinnostuksen kohteena, jotta erilaisia sairastumismekanismia voitaisiin ymmärtää. Lisäksi ne ovat potentiaalisia lääkeaineiden kohdentamisessa tiettyihin soluihin ja diagnostiikassa. Vesikkelit voivat kulkeutua vain tiettyyn kohdesoluun kalvon pintamolekyylien ohjaamana ja niiden koostumuksen perusteella voidaan selvittää solu, josta vesikkeli on peräisin. On mahdollista, että esimerkiksi ihmisen symbioottiset bakteerit ohjaavat suoliston soluja vesikkeleiden kautta tai patogeenit leviävät elimistössä tehokkaammin vesikkeleiden avulla. Monet erilaiset solut erittävät vesikkeleitä, mutta esimerkiksi syöpäsoluilla niiden sisältö poikkeaa terveiden solujen erittämistä vesikkeleistä ja siten vesikkeleitä voitaisiin hyödyntää diagnostiikassa (Shehzad ym., 2021). Syöpäsolut erittävät poikkeavia molekyylejä ympäristöönsä, mutta niiden havaitseminen on haastavaa. Vesikkeleissä molekyylit ovat varmemmin tunnistettavissa kuin jos pieniä, vapaita molekyylejä yritetään eristää suoraan esimerkiksi verestä. Koska vesikkelit pääsevät elimistössä kaikkialle, mutta niillä on omia kohdesoluja, voitaisiin niitä mahdollisesti käyttää lääkeaineiden kuljettamiseen elimistössä kohdennetusti tiettyyn kudokseen tai solutyypin (Gurung ym., 2021). Kiinnostusta herättää myös funktionaaliset elintarvikkeet, joihin voitaisiin suoraan lisätä hyödyllisiä vesikkeleitä.

Vesikkeleiden tarkkaa merkitystä ja sitä miten ne vaikuttavat ei tunneta vielä, mikä haittaa niiden käyttöä. Vesikkeleiden eristys on edelleen haastavaa ja hidasta, jotta sitä voitaisiin käyttää diagnostiikassa. Ei vielä tiedetä, pystytäänkö kaikkia mahdollisia vesikkeleitä eristämään ja niiden suuren määrän vuoksi on haastavaa osoittaa tietyn vesikkelityypin yhteyttä sairauksiin.

2.2 Autoimmuunisairaudet ja mikrobien vaikutus

Ihmisen suolisto tarjoaa erinomaisen ekolokeron mikrobeille elää, osa mikrobilajeista on pitkän yhteisen evoluution aikana kehittynyt symbioottisiksi eli hyödyllisiksi ihmiselle, osa lajeista on patogeenisiä eli potentiaalisia taudinaiheuttajia. Erilaisia mikrobeja elää erityisesti iholla, keuhkoissa, vaginassa ja suolistossa. Mikrobeista iso osa on erilaisia bakteereja, suolistossa enimmäkseen anaerobisia bakteereja, arkkeja, joitakin sieniiä ja mahdollisesti alkueläimiä. Tutkimukset osoittavat, että erityisesti varhaisessa lapsuudessa kehittyvä ihmisen mikrobiston koostumus vaikuttaa yhdessä geneettisen alttiuden kanssa monien autoimmuunisairauksien kehittymiseen. On todettu, että geneettisesti astmalle ja allergioille alttiit lapset sairastuvat useammin, jos varhaislapsuudessa mikrobisto kehittyy vajaavaisesti ja yksipuolisesti (Hufnagl ym., 2020). Tiettyjen laajakirjoisten antibioottien (klindamysiini) käyttö varhaislapsuudessa on osoitettu olevan yhteydessä esimerkiksi lasten reumaan (Sultan ym., 2019). Autoimmuunisairauksissa elimistö suhtautuu johonkin omaan kudokseen kuin se olisi vierasta ja uhkaavaa eli samalla tavalla kuin elimistöön pääseviin loisiin ja bakteereihin. Elimistön toiminnalle on kuitenkin välttämättömiä useat mikrobit esimerkiksi iholla ja ruoansulatuskanavassa, mutta olennaista on riittävän monipuolinen koostumus niin sanottuja hyviä mikrobeja, jotka elävät symbionteina ihmisen kanssa. Mahdollisesti epätyypillisten mikrobien suuri osuus elimistössä ja hyödyllisten mikrobien yksipuolisuus voi johtaa puolustusjärjestelmän häiriöön ja autoimmuunisairauden kehittymiseen. Voi syntyä tilanne, jossa suoliston mikrobiston häiriö aiheuttaa elimistössä laajemman tulehdustilan. Aina ei kuitenkaan voida olla varmoja siitä, onko mikrobiston muutos syy ja vai seuraus erilaisten sairauksien yhteydessä. Toisaalta elimistön puolustuksen heikentymisen myötä jokin normaaliin bakteeriflooraan kuuluva bakteeri voi päästä runsastumaan ja aiheuttaa infektion. Ihmiselimistön ja mikrobien välillä on jatkuva tasapainotila, jossa sekä ihmisen elimistö että muut mikrobit pitävät mikrobikannat hallittuina.

Nouseva kiinnostuksen kohde tutkimuksissa on mikrobiston kehittyminen jo sikiökaudella ja varhaislapsuudessa. On osoitettu, että esimerkiksi koliikkivauvoilla varhainen bakteerikanta yksipuoleinen ja maitohappobakteerien osuus on vähäinen. Normaalisti imeväisikäisellä lapsella on runsaasti tietyn tyypisiä, maitoa metabolisoivia bifidobakteereja, mutta kun ravinto muuttuu, muuttuvat myös bifidobakteerit enemmän oligosakkarideja käsitteleviksi (Li ym., 2020). Aiemmin uskottiin, että sikiöt ovat täysin steriilejä, mutta nykyisen käsityksen mukaan on mahdollista, että ne altistuvat jo kohdussa jossain määrin mikrobeille tai mikrobeista peräisin oleville molekyyleille (Rackaityte ym., 2020). Tiedetään, että äidistä peräisin olevat vesikkelit kulkevat istukasta sikiöön ja toisinpäin vesikkelit kulkevat sikiöstä äitiin (Sheller-Miller ym., 2019). Koska mikrobien erittämät vesikkelit pääsevät elimistössä kaikkialle, on perusteltua olettaa, että myös ne kulkeutuvat äidistä istukan kautta sikiöön. Äidin ympäristö ja erityisesti äidin syömät antibiootit voivat vaikuttaa jo sikiön mikrobiston kehitykseen ja edelleen immuunijärjestelmän kehittymiseen. Elimistön B-solut kehittävät vasta-aineita kohtaamiaan vieraita molekyylejä vastaan eli esimerkiksi bakteerien pintaproteiineja eli antigeenejä vastaan. Myöhemmin kun elimistö kohtaa saman molekyylin, se tunnistaa vieraan molekyylin nopeasti ja molekyylit tuhoetaan. Antigeenien lisäksi immuunipuolustuksen kehittymiseen vaikuttaa mikrobien erittämät aineenvaihduntayhdisteet, kuten lyhyet rasvahapot. Vastasyntynyt lapsi saa rintamaidosta vasta-aineita ja alkaa myöhemmin kehittää niitä itse vasteena elimistön kohtaamiin mikrobeihin. Rintamaidossa on myös yhdisteitä, jotka edistävät hyödyllisten bakteerien kasvua suolistossa. Lapsuudessa sairastetut infektiot vaikuttavat immuunipuolustuksen kehitykseen. Elimistön kohtaamat mikrobit vaikuttavat siihen, miten elimistö oppii tunnistamaan vieraita molekyylejä, mutta toisaalta se miten elimistö reagoi mikrobeihin vaikuttaa siihen, miten mikrobit pystyvät kolonisoimaan suolistoa ja edelleen lopulliseen mikrobiomin kehittymiseen (Janzon ym., 2019).

Pitkään on epäilty, että mikäli elimistö ei varhaislapsuudessa kohtaa riittävästi mikrobeja, sen kyky tunnistaa niitä ei kehity normaalisti, mikä voi johtaa hyökkäämiseen vaarattomia molekyylejä vastaan. Autoimmuunisairauksissa elimistö reagoi omiin kudoksiin kuin vieraisiin ja allergioissa vaarattomiin molekyyleihin, jotka ovat peräisin esimerkiksi kasvien siitepölystä tai eläinten hilseestä. Niin sanottu hygieniahypoteesi olettaa, että kaupungistumisen/länsimaalaistumisen seurauksena autoimmuuni- ja allergiasairaudet ovat lisääntyneet. Kehittyneen hygienian ja vähäisemmän luonto- sekä eläinyhteyden takia lapset altistuvat vähemmän mikrobeille. Maaseudulla erityisesti nautojen läheisyydessä lapsuutensa eläneillä on vähemmän autoimmuunisairauksia ja allergioita (von Mutius & Radon, 2008).

Lemmikkieläimistä erityisesti koirat tuovat mukanaan runsaasti mikrobeja, mikä monipuolistaa ihmisten mikrobialtistusta. Autoimmuunisairauksien määrä on kasvanut viime vuosikymmeninä länsimaissa. Toisaalta kehittynyt hygienia myös suojaa monilta vakavilta infektioilta, joiden hoito voisi vaatia raskaita antibioottikuureja ja jotka voisivat aiheuttaa pitkäaikaisia terveysvaikutuksia. Yksi pelätyimpiä tulevaisuuden terveysuhkia ihmiskunnalle on antibioottiresistenttien bakteerien lisääntyminen, joka voi aiheuttaa runsaasti kuolemia.

Suoliston mikrobistosta puhutaan usein ”toisina aivoina”, mutta sitä ei voi verrata elimistön omiin elimiin. Mikrobit toimivat oman etunsa mukaisesti, joka voi olla hyödyllistä tai haitallista isännälle. Toisaalta rauhallinen yhteiselo on usein mikrobinkin etu. Kuitenkin nimitys ”toisista aivoista” on perusteltu siinä mielessä, että suoliston mikrobit erittävät useita välittäjäaineita, kuten gamma-aminovoihappoa (GABA) ja serotoniinia, jotka säätelevät monia elimistön normaaleja toimintoja ja toisaalta voivat olla yhteydessä joihinkin hermostollisiin sekä psykiatriisiin sairauksiin (Dinan & Cryan, 2020). Tämä on yksi esimerkki suolistoaivo-yhteydestä (gut-brain axis), mutta suoliston mikrobit erittävät paljon muitakin välttämättömiä yhdisteitä, kuten vitamiineja. Aikuisilla suolistomikrobien erittämät matala-asteista tulehdusta ylläpitävät yhdisteet on yhdistetty nivelen tulehdusmuutoksiin (Hao ym., 2021).

Tiedetään, että esimerkiksi maitohappobakteerit edistävät yleisesti suoliston terveyttä ja toisaalta esimerkiksi *Clostridium difficile* -bakteerin vaikutus suolistossa on terveydelle haitallinen (Sehgal & Khanna, 2021; Toscano ym., 2017). On myös löydetty yhteyksiä tietynlaisen mikrobikoostumuksen suotuisasta vaikutuksesta joissakin tilanteissa, kun henkilöllä on alttius sairastua ja toisaalta vajaavainen mikrobikoostumus voi edesauttaa sairauden puhkeamista. Ei kuitenkaan tiedetä millainen mikrobiomi olisi kaikkein parhaaksi terveydelle. Mikrobiston yksipuolisuus on haitallista, mutta ihmisten välillä voi olla eroja siinä, millainen mikrobisto olisi paras ja luontaisesti terveilläkin henkilöillä on eroava mikrobisto, esimerkiksi eri maantieteellisillä alueilla elävillä kansoilla mikrobialtistus eroaa toisistaan. Ihmisen elimistöä asuttavien mikrobien välillä vallitsee kilpailu resursseista, joten yksinkertaistettuna voisi ajatella, että mitä runsaammin hyödyllisiä mikrobeja on, sitä vaikeampi haitallisen on päästä runsastumaan. Aikuisen suoliston mikrobisto ei kovin herkästi muutu eikä sitä yleensä saa tarkoituksella muutettua pysyvästi, mutta suuret ympäristön ja ravinnon muutokset, sairaustilat sekä erityisesti antibiootit voivat saada mikrobiston epätasapainoon. Lapsilla vasta kehittyvä suoliston mikrobisto on herkempi häiriöille ja vaikutukset voivat olla pitkäaikaisempia.

Monitekijäisissä sairauksissa yksi merkittävä ympäristötekijä on ravinto. Nisäkkään elimistö on sopeutunut hyödyntämään maitoa imeväisiässä ja jossain määrin vielä senkin jälkeen. Tyypillisesti suoliston mikrobiston hyvinvointia edistää erityisesti runsaasti kasviksia, kuitua ja pehmeitä rasvoja sisältävä ruokavalio. Ruoassa olevista vesikkeleistä voidaan käyttää lyhennettä FDE (Food-derived exosomes). Elimistö tuhoaa tehokkaasti ruoassa olevia mikrobeja ja ravinteiden hyödyntäminen vaatii, että ruoan ravintoaineet pilkotaan huolellisesti. Vesikkelit kuitenkin säilyvät hyvin ja kulkeutuvat ruoansulatuskanavasta muualle elimistöön pienen kokonsa ja lipidikalvonsa ansiosta. Vesikkeliin sisältö säilyy myös paljon paremmin kuin se säilyisi ilman lipidikalvoa. Koska kaikki elävä erittää vesikkeleitä on niitä myös kaikessa vähän käsitellyssä ravinnossa. (Munir ym., 2020). On kuitenkin mahdollista, että ruoan voimakas käsittely, esimerkiksi voimakas kuumennus, voi tuhota myös vesikkeleitä, mutta ei todennäköisesti kaikkia. Mikrobien vesikkelit voivat siis vaikuttaa elimistöön silloinkin, kun itse mikrobi ei säily elävänä ruoansulatuskanavassa. On todennäköistä, että ruoan terveysvaikutukset tai haittavaikutukset perustuvat osittain sen sisältämiin vesikkeleihin. Yksi kiistanalainen ravintoaine on lehmän maito, jonka on osoitettu hiirikokeissa hidastavan aikuisten reuman puhkeamista, mutta toisaalta se voi lisätä muita tulehdustiloja (Arntz ym., 2015).

2.3 Juveniili artriitti

Lasten reuma eli juveniili artriitti on niveliin kohdistuva tulehduksellinen autoimmuunisairaus. Sairaus kehittyy usein lapsuudessa, alle 16-vuotiaana, erotuksena aikuisena kehittyvään reumaan. Vuosittain Suomessa sairastuu noin 200 lasta ja sairaus on yleisempi tytöillä kuin pojilla (Malin & Markula-Patjas, 2020). Sairaus ilmenee yhdessä tai useammissa nivelissä aiheuttaen muun muassa kipua ja vaikeuksia liikkua. Usein lapsuudessa puhkeava reuma helpottaa aikuistumisen myötä, mutta joillakin oireet jatkuvat voimakkaana läpi elämän. Lasten reumalle on erilaisia alatyyppejä, joissa oireiden sijainti ja voimakkuus vaihtelee. Tyypillisesti lasten reuma luokitellaan kuuteen erilaiseen alatyyppiin. Alatyypin ennustaa osittain taudinkulkua ja antaa viitteitä tehokkaimman hoitomuodon valintaan. Hankalimmissa tapauksissa oireita voi olla myös muualla elimistössä kuin nivelissä, esimerkiksi imusolmukkeissa, sisäelimissä tai silmissä. Viime vuosina hoidot ovat kehittyneet ja erityisiä biologisia lääkkeitä on tullut reuman hoitoon. Varhainen hoito ennaltaehkäisee taudin

pahentumista. Tautia ei voida täysin parantaa, mutta useimmissa tapauksissa sen eteneminen voidaan pysäyttää ja oireilua vähentää tehokkaasti (Jalanko, 2019).

Tarkkaa lasten reuman sairastumisemekanismia ei tunneta, mutta nykytiedon valossa sen katsotaan olevan monitekijäinen autoimmuunisairaus, joten sairastumiseen vaikuttavat sekä geneettinen alttius että ympäristötekijät ja sairaus johtuu elimistön hyökkäyksestä omia kudoksia vastaan kuin ne olisivat vieraita ja uhka elimistölle. Joitakin spesifejä geenimutaatioita tunnetaan, jotka ovat voimakkaasti yhteydessä lasten reumaan. Lasten reumaan voimakkaasti yhteydessä olevina kandidaattigeneinä pidetään geenialueita, jotka koodaavat ihmisen leukosyyttiantigeeniä (Human leukocyte antigen) eli HLA (Pralad & Glass, 2008). HLA:t ovat geenialueita, jotka ovat olennaisessa osassa tehokasta immuunipuolustusta ja niiden mutaatiot ovat yhteydessä useisiin autoimmuunisairauksiin. Silti mutaatiot HLA-alueilla selittävät vain osittain sairastumisen (Pralad ym., 2000). Todennäköistä on, että lukuisat geenit yhdessä ympäristötekijöiden kanssa aiheuttavat sairastumisen niin, että jokin ympäristötekijä voi laukaista sairauden puhkeamisen, kun geneettinen alttius on olemassa. Tutkimuksissa on löydetty 700 neutrofiileihin vaikuttavaa geeniä, joiden aktiivisuus on erilainen lasten reumaa sairastavilla ja terveillä (Jarvis ym., 2006). Neutrofiilit ovat valkosoluja, jotka osallistuvat elimistön puolustukseen ja aiheuttavat tulehdusreaktion. Ympäristötekijöitä ovat esimerkiksi erilaiset kemikaalit ja ravinto, mutta autoimmuunisairauksissa erityisen olennaisina pidetään erilaisia mikrobeja, joita lapsen vielä kehittyvä elimistö kohtaa oppiessaan erottamaan hyödylliset haitallisista patogeneistä.

PTPN22 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22) on proteiini, joka osallistuu immuunijärjestelmän T-solujen aktiivisuuden säätelyyn. Sen mutaatiot nostavat riskiä sairastua lasten reumaan ja muihin autoimmuunisairauksiin (Goulielmos ym., 2016). T-solut ovat toinen imusolujen pääsolutyyppejä. Ne tuhoavat paikallisesti elimistön omia vahingoittuneita tai mutatoituneita soluja. Kohdesolunsa ne tunnistavat MHC-proteiineista (major histocompatibility complex), joista puhtaasti myös HLA-antigeneinä. MHC-proteiini tarttuu kaikkiin vieraisiin peptideihin, esimerkiksi mikrobiperäisiin, ja esittelee niitä T-soluille. Elimistön T-solut tuhoavat kaikki vieraita peptidejä esittelevät MHC:tä sisältävät solut ja autoimmuunisairauksissa virheellisesti myös omia peptidejä esittelevät solut. Useat MHC haplotyypit on yhdistetty lukuisiin autoimmuunisairauksiin (Fernando ym., 2008).

Monitekijäisten sairauksien alttiusgeenien toteaminen on haastavaa. Tarvitaan laajoja genomin kattavia analyysejä ja usein yhteys geenien ja sairauden välillä ei ole riittävän selkeä. Myös epigenetiikalla on osuutensa sairastumiseen, jolloin jopa vanhempien kokema ympäristöaltistus

voi vaikuttaa geenien aktiivisuuteen. On esimerkiksi havaittu metylaatiota tietyissä nivelen soluissa ja kyseiset muutokset on yhdistetty reumaan (Hammaker & Firestein, 2018). Tyypillisesti yhden geenin aiheuttama sairastuminen johtuu esimerkiksi vääränlaisesta toimimattomasta tai tehottomasta proteiinista, ja sairauden oireet ovat seuraus toimivan proteiinin puutteesta. Monitekijäisissä sairauksissa asia on monimutkaisempi ja oireiden kehittymiseen vaikuttaa useiden geenien aktiivisuuden muutokset eikä periytyminen noudata Mendelin lakeja. Geenin ei välttämättä tarvitse tuottaa viallista geenituotetta vaan se voi toimia liian aktiivisesti tai passiivisesti eli geenin ilmentyminen on muuttunut. Ympäristötekijät voivat suoraan vahingoittaa DNA:n rakennetta ja edelleen geeniä; näin käy esimerkiksi karsinogeenien vaikutuksesta. Ympäristötekijät voivat myös aiheuttaa geenien toiminnan muutoksia, jotka voivat olla välttämättömiä vasteita ympäristölle, mutta johtaa samalla johonkin niin sanotusti epänormaaliin elimistön toimintoon. Tyypillisiä epigeneettisiä muutoksia ovat esimerkiksi histonien modifikaatiot ja DNA:n metylaatiot, jotka molemmat vaikuttavat siihen, kuinka paljon geeniä koodataan ja geenituotetta syntyy. Epigeneettisiä muutoksia voivat aiheuttaa ympäristötekijät ja ne voivat periytyä, vaikka geenin rakenne ei muutu.

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, eroaako lasten reumaa sairastavien lasten bakteeriperäisten vesikkeleiden määrä ja niiden proteiinit terveiden verrokkien bakteeriperäisistä vesikkeleistä. Mikrobin tunnistaminen tehtiin eristämällä vesikkeleitä ulosteesta ja selvittämällä niiden sisältämien proteiinien sekvenssi, jonka perusteella voitiin tunnistaa mikrobeja. Tuloksia verrattiin sairaiden lasten terveiden sisarusten tuloksiin, jotta lasten genotyyppi olisi mahdollisimman samanlainen eikä erot sairastumisalttiudessa johtuisi eroista genotyyppissä. Lisäksi tuloksia voidaan käyttää selvittäessä suoliston mikrobin erittämien vesikkeleiden merkitystä lasten reuman sairausmekanismissa. Vesikkeleiden merkityksen ymmärtäminen voi auttaa ennaltaehkäisemään, diagnosoimaan ja hoitamaan useita erilaisia sairauksia.

3. Menetelmät

3.1 Näytteiden suodattaminen

Tutkimuksessa käytettiin -80 °C säilytettyjä ulostenäytteitä. Näytteitä oli 20 kpl lasten reumaa sairastavilta ja 14 kpl terveiltä verrokeilta. Sairaiden näytteet kerättiin, kun diagnoosi tehtiin, mutta ennen lääkitystä, jotta se ei vaikuttaisi tuloksiin. Tutkimusmateriaalina käytettiin 800–1000 mg ulostetta, vaikka alkuperäisessä protokollassa neuvottiin käyttämään 4 g ulostetta. Tutkimusryhmässä oli kuitenkin todettu, että vesikkeleitä tulee reilusti huomattavasti pienemmästäkin näytemäärästä ja näyte on helpompi puhdistaa, kun ulostemassaa on vähemmän. Alussa uloste jaettiin kahteen eri falconputkeen, jolloin käsittely oli helpompaa. Suodatuksen jälkeen molempien putkien näyte yhdistettiin yhteen. Ulostetta sekoitettiin falconputkessa 25 ml 1x puskuroituun suolaliuokseen (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, PBS) ja puhdistettiin sentrifugoimalla (5810 R, Eppendorf) 14 000 g 30 min +4 °C:ssa ja suodattamalla käyttäen 40 µm nylon filtriä (Falcon Cell Stainer) sekä 0,45 µm PES-filtriä (Biofil 1000 m Vacuum Bottle Filter). Kaikki vaiheet tehtiin jäällä bakteerikasvun hidastamiseksi.

3.2 Näytteiden konsentrointi

Näytteiden konsentrointi tehtiin käyttämällä Centricon® Plus-70 sentrifuugifilttereitä (PL-100, Merck Millipore) ja toimimalla valmistajan ohjeiden mukaisesti. Filtrit pestiin 1xPBS:llä, sentrifugoimalla (Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments) 3500 g 5 min +4 °C:ssa sekä edelleen 1000 g 2 min +4 °C. Näytteiden konsentroimiseksi ne sentrifugoitiin 3500 g 45 min +4 °C:ssa sekä edelleen 1000 g 2 min +4 °C:ssa. Osa näytteistä konsentroitiin käyttämällä Amicon ultra-15 centrifugal filtering -laitetta (100K, #UFC910024, Merck Millipore). Laitte huuhdeltiin 1xPBS, sentrifugoitiin 300 g 5 min, PBS:n tilalle laitettiin näyte, sentrifugoitiin 3000 g 30 min +4 °C:ssa (5810 R, A-4–62 roottori). Konsentraatitavoilla ei ole merkitystä lopputulokseen, koska niiden huokoisen koko, eli kyky läpäistä partikkeleita, on sama.

3.3 Vesikkeleiden eristys

Vesikkeleiden eristämiseen käytettiin Exo-Spin™ Mini-Columnneja (#EX03; Cell Guidance Systems). Eristäminen tehtiin Exo-Spin™ Exosome Purification Kit (#EX01; Cell Guidance Systems) ohjeen kohtien 8–12 mukaisesti. Kolumni puhdistettiin sentrifugoimalla (5810 R, Eppendorf) 50 g 10 sekuntia ja puhdistettiin 1xPBS:llä 50 g 10 sekuntia. Näytteen saamiseksi

kolumniin sentrifugoitiin 50 g 60 sekuntia ja eluoiitiin vesikkelit 1xPBS:llä sekä sentrifugoimalla 50 g 60 sekuntia. Saatu näytteen lopullinen tilavuus oli noin 200 µl.

3.4 Vesikkeleiden puhdistaminen

Vesikkeleiden puhdistaminen tehtiin OptiPrep™ tiheys gradientti sentrifugointiohjeen mukaisesti. Homogenisointi mediumin (Homogenation medium, HM) pH 7,4, konsentraatiot olivat 0.25 M sakkaroosi, 10 mM Tris(hydroksimetyyli)aminometaani (Tris-HCl) ja 1 mM Metyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA). Vastaavasti työskentelypuskurin (Working solution buffer, WB) pH 7,4 konsentraatiot olivat sakkaroosi 0.25 M, Tris-HCl 60 mM ja EDTA 6 mM. Työskentelyliuoksen valmistamiseksi käytettiin 1 tilavuus työskentelypuskuria (WB) suhteessa 5 tilavuuteen OptiPrep:ä (60 % iodixanol). Työskentelyliuoksesta ja homogenointi mediumista valmistettiin 5 %, 10 %, 20 % ja 40 % liuokset. Liuokset pipetoitiin ultrasentrifuugiputkiin (Ultra-Clear Centrifuge Tubes, Beckman Coulter) järjestyksessä alkaen 40 % - liuoksesta ja lopuksi 5 % -liuos. Päällimmäiseksi pipetoitiin näyte. Näytteet ultrasentrifugoitiin (Optima L-100/L-90 ultrasentrifuugi, Beckmann) 100 000 g, yön yli eli noin 15-17 h, +4 °C:ssa.



Kuva 2. Kuvan koeputkessa on nähtävissä eri pitoisten iodixanol-liuosten faasirajat.

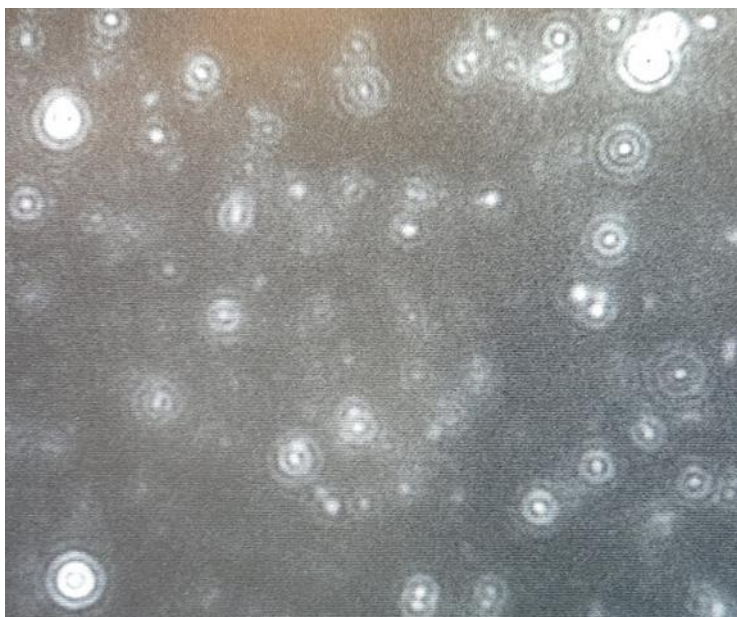
Näyte pipetoitiin järjestyksessä pinnalta alaspäin kymmeneen fraktioon. Fraktiot 5-7 ja 1xPBS pipetoitiin polypropyleeniputkiin (Polypropylene Centrifuge Tubes, Beckman Coulter) ja sentrifugoitiin edellä mainitulla ultrasentrifuugilla 100 000 g, 2,5-3 h +4°C:ssa. Supernatantti kaadettiin pois ja pelletti liuotettiin 1xPBS:ään.

3.5 Näytteiden kuvaaminen

Näytteet kuvattiin elektronimikroskoopilla (Tecnai™ G2 Spirit 120kV TEM), jotta nähtiin missä osanäytteissä on vesikkeleitä, voitiin arvioida karkeasti, kuinka paljon niitä on ja nähtiin ovatko näytteet riittävän puhtaat, jotta niitä kannattaa käyttää seuraavissa vaiheissa. Suuret ylimääräiset partikkelit häirisevät erityisesti Nanosight-analyysiä. Näytteet värjättiin negatiivi

värjäyksellä Biocenter Oulu:n elektronimikroskoppiyksikössä. Negatiivisena kontrollina käytettiin 1xPBS.

Riittävän puhtaat osanäytteet 5–7 yhdistettiin, laimennettiin 1:25 PBS:llä ja kuvattiin Nanosight:lla (NanoSight NS300 (Malvern)). Nanosight on laite, joka pystyy laskemaan hyvin pienten, nanometrien luokkaa olevien, partikkeleiden konsentraation ja halkaisijan käyttämällä laserin aiheuttamia heijastuksia (nanoparticle tracking analysis, NTA) Nanosight-laitteeseen laitettiin laimennettua vesikkeliliuosta ja laite teki useita peräkkäisiä mittauksia. Nanosight antaa tietoa useassa eri muodossa: suoraan lukuina, joita käytettiin tulosten käsittelyssä sekä erilaisina kuvaajina. Erityisen isot partikkelit tai liian laimea tai väkevä liuos aiheuttaa häiriötä ja tällöin tulos ei ole luotettava. Epäonnistuneet mittaukset toistettiin, mutta mikäli tulos oli edelleen epäluotettava, jätettiin näyte pois lopullista tuloksista



Kuva 3. Näkymä vesikkeleistä Nanosight:n näytöltä mittauksen aikana.

3.6 Proteiinien eristys

Proteiinien eristystä varten näytteeseen lisättiin vettä, metanolia ja kloroformia. Näyte sekoitettiin ja sentrifugoitiin 14 000 g 1 min. Vesi ja metanoli poistettiin ja lisättiin uudestaan metanolia. Näyte sentrifugoitiin 20 000 g 5 min. Neste poistettiin ja pelletin annettiin kuivua 20 min. Näytteeseen lisättiin 5 µl 4 x Laemmli loading puskuria (Bio-Rad) ja 15 µl vettä. Näytteet keitettiin 5 min +95 °C:ssa. Näytteet säilytettiin -20 °C:ssa.

Näytteet sulatettiin ja keitettiin uudelleen 5 min +95 °C. Näytteet pipetoitiin 12 % erottelugeelille (Mini-Protean TGX, Bio-Rad) ja ajettiin elektroforeesi 110V 15 min. Ajopuskurina käytettiin 1 % tris-glysiini SDS-puskuria, pH 8.3. Geeliä fiksoitiin 30 min 50 % etanolissa ja 10 % etikkahapossa huonelämpötilassa sekoittajassa. Geeli huuhdeltiin vedellä. Geeli värjättiin 1x Sypro Ruby (Bio-Rad) -väriaineella yön yli huoneenlämpötilassa sekoittajassa. Väri poistettiin huuhtelemalla 5 % etikkahapolla 5 min sekoittajassa. Geelin annettiin olla 15 min kahdesti tislatussa vedessä (double distilled water) sekoittajassa. Näytteet geelissä leikattiin erilleen UV-valossa. Näytteet kuivattiin lisäämällä absoluuttista etanolia, sekoittamalla ja antamalla olla 5 min. Etanoli poistettiin ja toistettiin käsittely. Lopulta saatiin kuiva, kova geelin pala.



Kuva 4. Kuvan eppendorffputkessa näkyy kuiva, kova geelinpala etanoliliuoksessa.

Näytteet lähetettiin Turkuun proteomiikan yksikköön, jossa näytteiden proteiinit tunnistettiin massaspektrometrillä ja josta saatiin raakadata proteiineista ja niiden mahdollisesta alkuperästä.

3.7 Tulosten käsittely

Tulokset käsiteltiin Microsoft Excelillä. Excelillä laskettiin laimennettujen näytteiden todellinen konsentraatio, varianssi, t-testi, keskiarvot ja tehtiin havainnollistavia ruutu- ja jana-kuvaajia. Laskujen ulkopuolelle jätettiin näytteet, joiden mittaus oli Nanosight-laitteen mukaan epäluotettava.

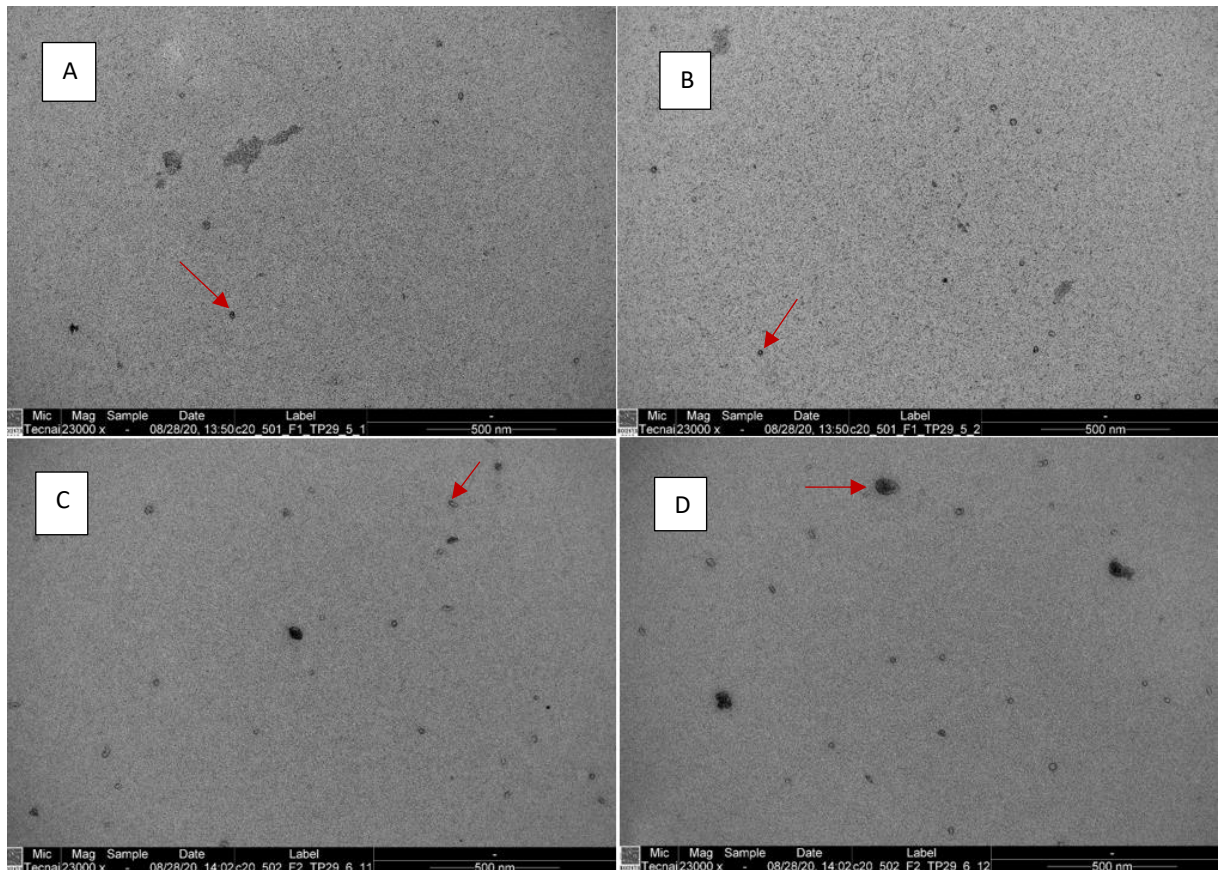
4. Tulokset

Tutkimuksessa ulosteesta eristetyt vesikkelit kuvattiin elektronimikroskoopilla, jotta voitiin arvioida näytteen eristyksen ja puhdistuksen onnistumista. Sen jälkeen riittävän hyvät näytteet kuvattiin Nanosight-laitteistolla (NTA), jotta saatiin tietää näytteen partikkelien konsentraatiot ja partikkeleiden halkaisijat. Riittävän hyvänä pidettiin näytettä, jossa on vesikkeleitä enemmän kuin epäpuhtautta silmämääräisesti arvioituna. Jos näytteessä ei ollut lainkaan vesikkeleitä, jätettiin se pois.

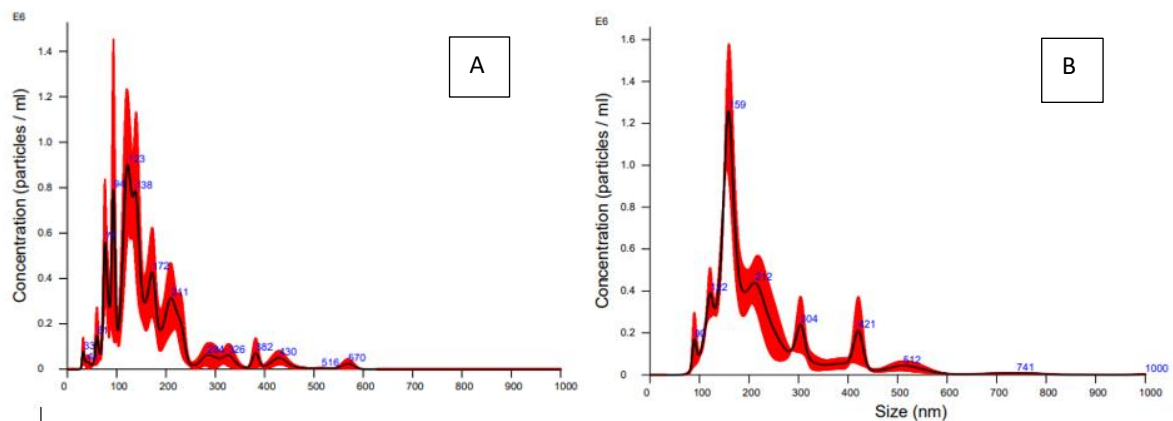
Tuloksissa on esitetty mahdollisimman kattavasti erityyppisiä näytteitä sekä kontrolleista että reumanäytteistä (JIA-näytteet). Jokaisen elektronimikroskooppikuvan, kuvat 5.1–13.1, alalaidassa on mitta 500 nm, johon kuvan vesikkeleitä on verrattu. NTA tuloksista on esitetty kuvaaja, kuvat 5.2–13.2, joissa on esitetty 1:25 laimennettujen näytteiden partikkelikonsentraatio y-akselilla ja partikkeleiden halkaisijan jakautuminen x-akselilla.

Ensimmäiselle näytteelle on tehty NTA-analyysi kaksi kertaa (kuva 5.2A-B), koska ensimmäinen mittaus ei ollut luotettava.

Ensimmäisen mittauksen (kuva 5.2A), vesikkeleiden halkaisija vastaa enemmän kuvan 5.1 vesikkeleiden halkaisijaa, jotka ovat verrattaen pienempiä kuin muissa näytteissä näkyvien vesikkeleiden. Kuvasta 5.1 voidaan nähdä, että näytteessä on runsaasti pieniä puhdistettuja ulosteperäisiä vesikkeleitä. Kuvista arvioituna vesikkeleiden halkaisijat ovat välillä 10–150 nm. Kuvan 5.2A mukaan partikkeleiden halkaisija on välillä 33–570 nm. Suurin konsentraatiopiikki on 123 nm halkaisijan kohdalla, joiden konsentraatio on noin 0.9×10^6 partikkelia per ml. Kuvan 5.2B mukaan partikkeleiden halkaisija on välillä 90–741 nm, suurimman konsentraation ollessa 159 nm halkaisijaltaan olevilla. 159 nm halkaisijaltaan olevien konsentraatio on noin 1.25×10^6 partikkelia per ml.



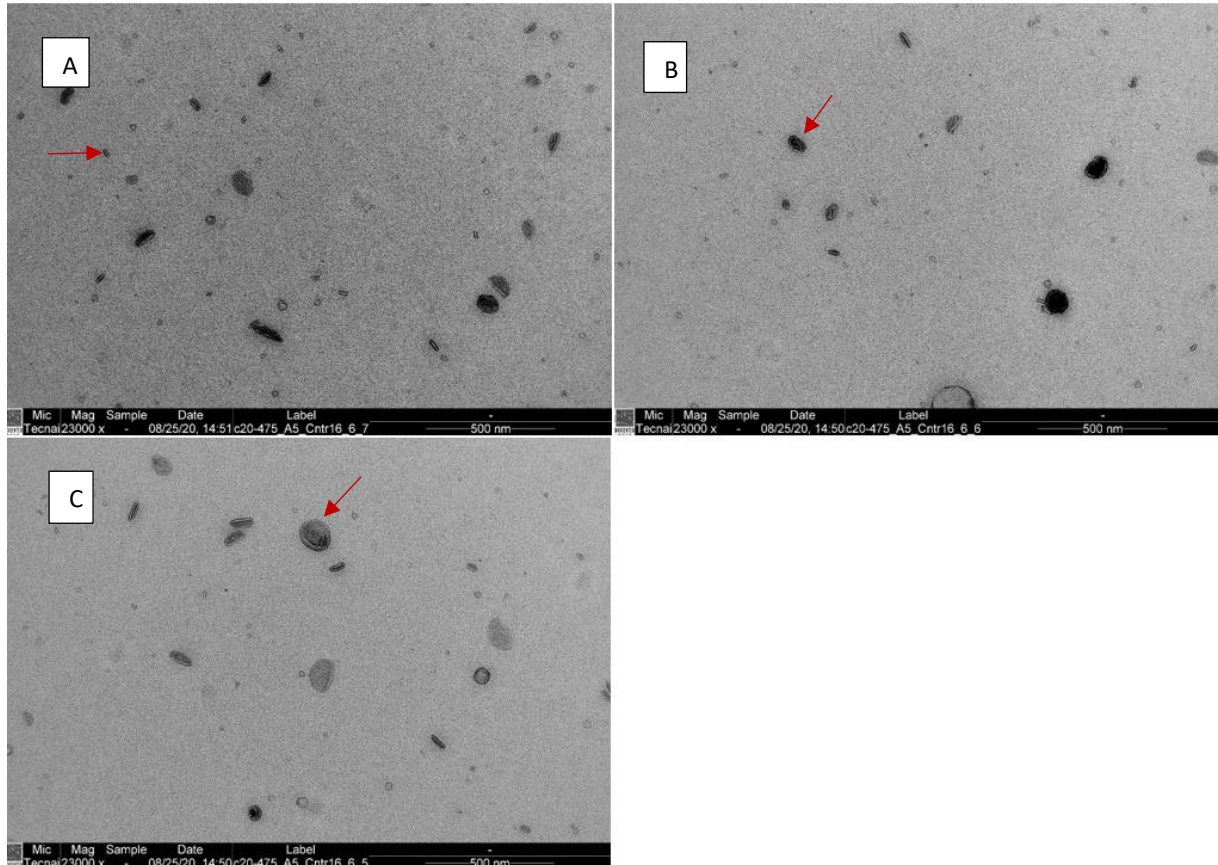
Kuva 5.1. Ensimmäinen kontrollinäyte läpäisyelektronimikroskoopilla kuvattuna. Paneelit A ja B ovat tiheysgradientin fraktiosta 5, paneelit C ja D fraktiosta 6. Kuvassa näkyy pieniä ulosteperäisiä vesikkeleitä, halkaisijaltaan noin 10–150 nm. Kuvaan on merkitty muutamia vesikkeleitä punaisella nuolella.



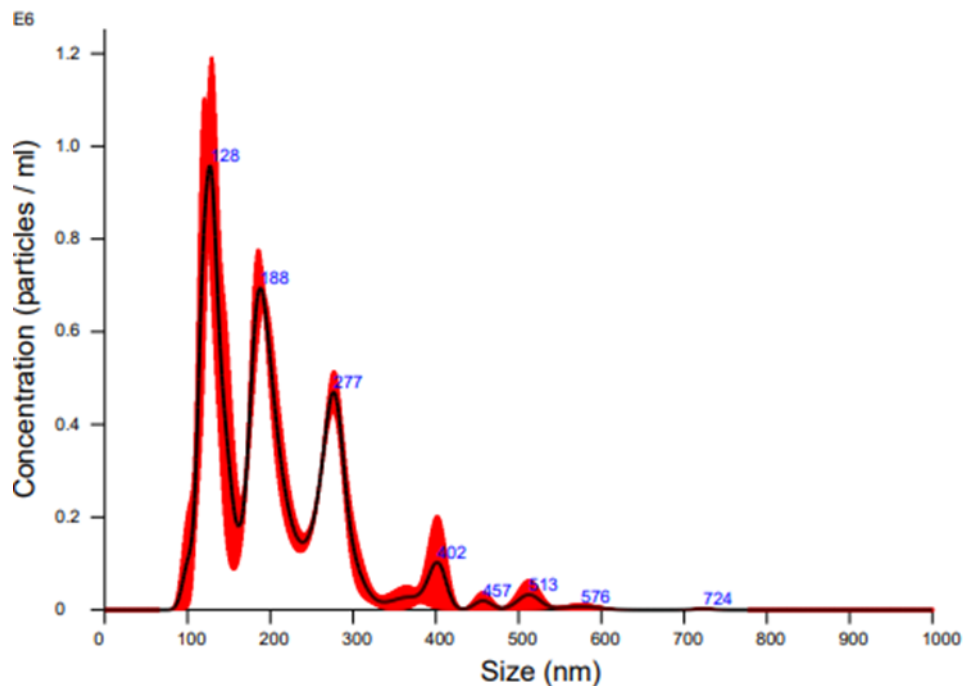
Kuva 5.2. Ensimmäinen kontrollinäyte NTA-analysoituna. Paneeli A on ensimmäisestä mittauksesta ja paneeli B toisesta mittauksesta. Ensimmäinen mittaus, paneeli A, oli Nanosight-laitteen mukaan epäluotettava ja toisessa mittauksessa, paneeli B, oli taustamelua.

Kuvan 6.1 näyte on muihin näytteisiin verrattuna hyvä näyte koska kuvan 6.1 perusteella arvioituna runaasti vesikkeleitä suhteessa epäpuhtauksiin. Kuvassa 6.1 vesikkeliön halkaisija

on arviolta 10–200 nm, kuvan 6.2 NTA-analyysissä alle 100 nm halkaisijaltaan olevia vesikkeleitä ei erotu ja valtaosa on noin 150–300 nm halkaisijaltaan.

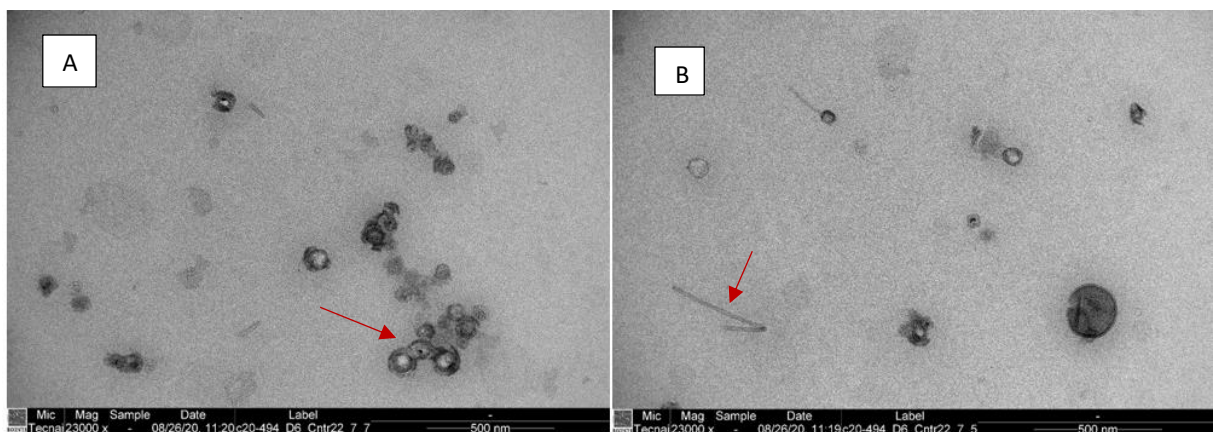


Kuva 6.1. Toinen kontrollinäyte läpäisyelektronimikroskoopilla kuvattuna. Kaikki paneelit A-C ovat tiheysgradientin fraktiosta 6. Näytteessä on eri kokoisia ulosteperäisiä vesikkeleitä. Vesikkeleiden halkaisija on kuvasta arvioituna noin 10–200 nm. Kuvaan on merkitty muutamia vesikkeleitä punaisella nuolella.



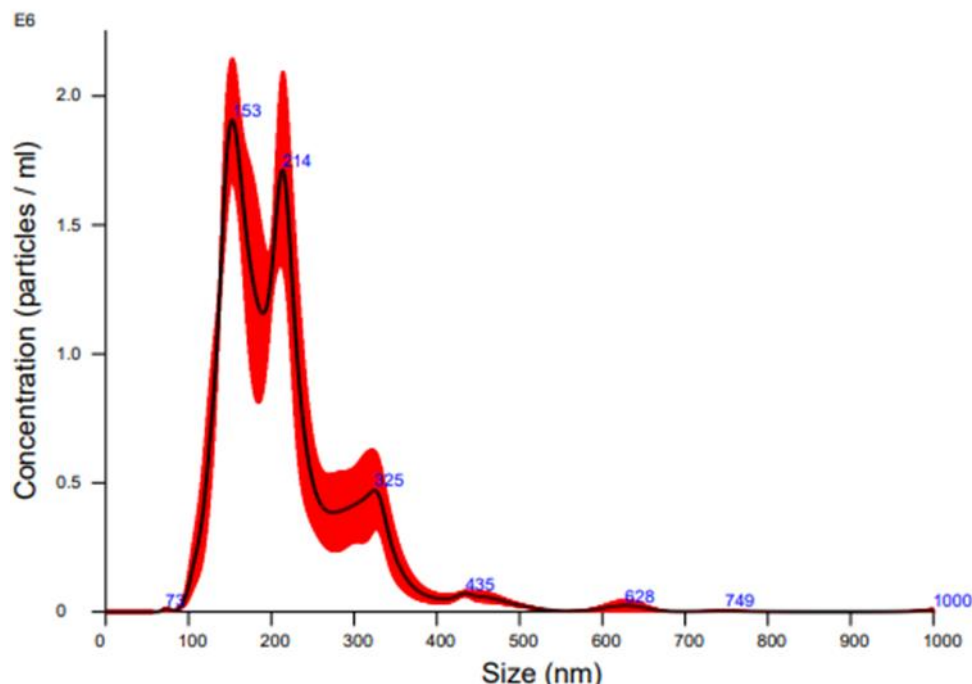
Kuva 6.2. Toinen kontrollinäyte NTA-analysoituna. Kuvan perusteella näytteen partikkelit ovat halkaisijaltaan välillä 128–724 nm, kuitenkin suurin konsentraatio on 128 nm halkaisijaltaan olevilla. 128 nm halkaisijaltaan olevien konsentraatio on noin 0.95×10^6 partikkelia per ml.

Kuvassa 7.1A vesikkelit ovat aggregoituneet eli tarttuneet toisiinsa. Kuvissa 7.1A-B näkyy epäpuhtautta, kuvassa 7.1B epäpuhtaudet näyttävät flagelloilta. Kuvan 7.1 vesikkeleiden halkaisija on kuvasta arvioituna noin 50-300nm. Kuvan 7.2 NTA-analyysissä pienimmät mitatut partikkelin halkaisijat ovat 73 nm ja suurimmat yli 700 nm, iso osa partikkeleista on 150–300 nm halkaisijaltaan.



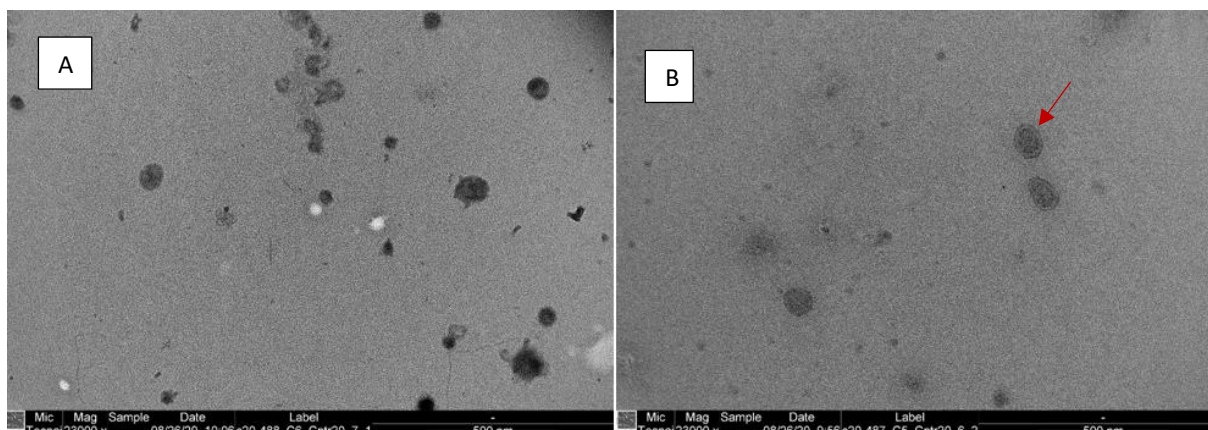
Kuva 7.1. Paneeleissa A-B on kolmas kontrollinäyte läpäisyelektronimikroskoopilla kuvattuna. Paneelit A-B tiheysgradientin fraktiosta 7. Kuvasta voidaan nähdä, että näytteessä on ulosteperäisiä vesikkeleitä

ja paneelissa A ne ovat aggregoituneet (merkitty punaisella nuolella). Paneelissa B näkyy flagelloja (merkitty punaisella nuolella). Flagellat ovat joidenkin bakteerien siimoja, joiden avulla ne voivat liikkua. Kuvista arvioituna vesikkeleiden halkaisija on noin 50–300 nm.

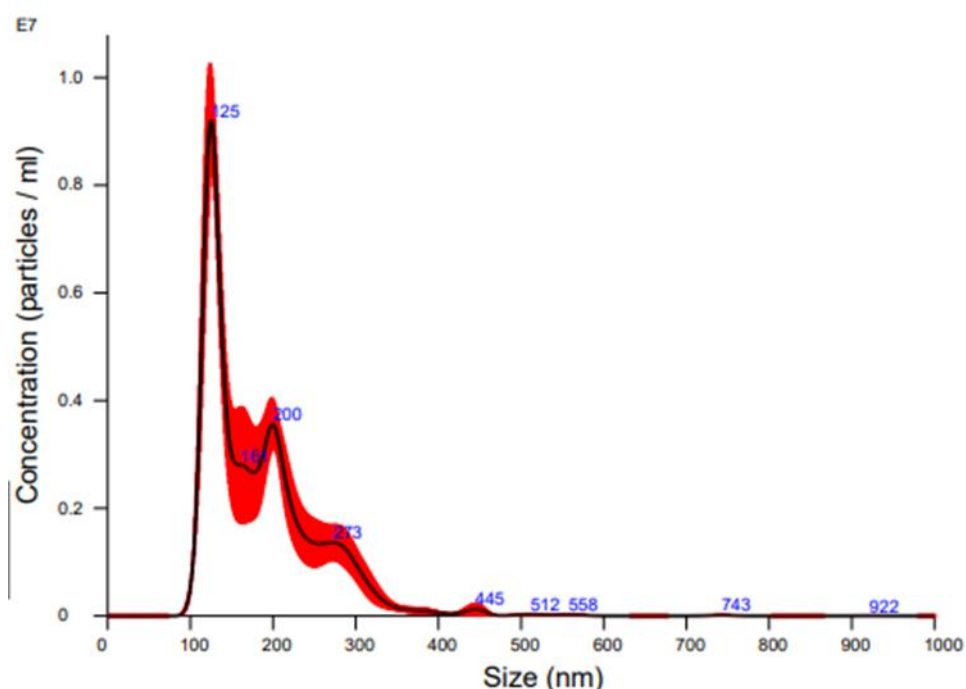


Kuva 7.2. Kuvassa kolmas kontrollinäyte NTA-analysoituna. Kuvan perusteella partikkelien halkaisija on välillä 73–749 nm. Eniten on partikkeleita, joiden halkaisija on 153 nm ja niiden konsentraatio on noin 1.9E+06 partikkelia per ml.

Kuvissa 8.1A-B näkyy vesikkeleiden lisäksi epäpuhtautta. Kuvassa 8.1B erottuu vesikkeleiden kalvorakenne. Kuvasta 8.1A on haastavaa arvioida ovatko kaikki näkyvät rakenteet todennäköisesti vesikkeleitä, koska vesikkelille tyypillinen kalvorakenne ei erotu kaikista partikkeleista. Kuvissa 8.1 ja 8.2 vesikkeleiden halkaisijat vastaavat toisiaan. Kuvassa 8.1 vesikkeleiden halkaisija on kuvasta arvioituna noin 100-200nm. Kuvassa 8.2 NTA-analyysissä valtaosa partikkeleista on halkaisijaltaan 125–300 nm.

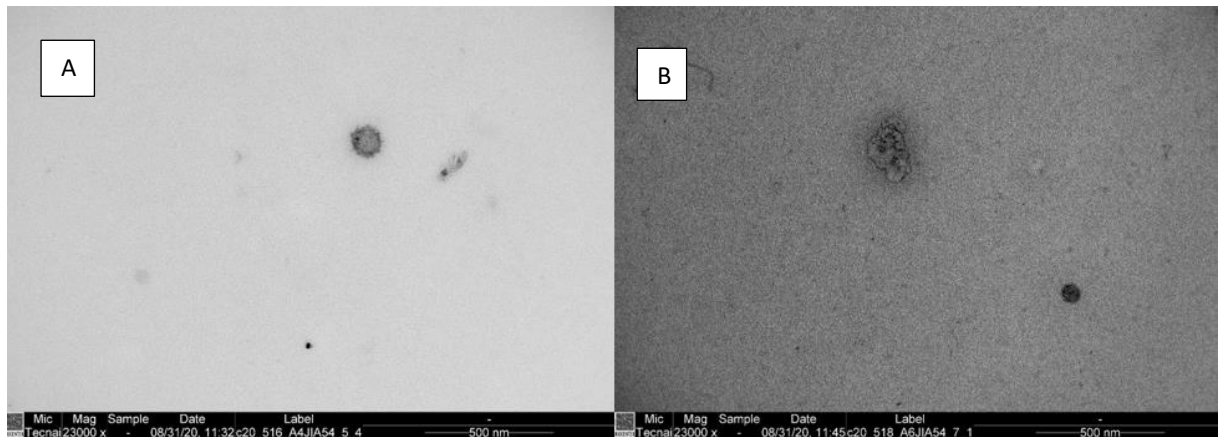


Kuva 8.1. Paneeleissa A-B on neljäs kontrollinäyte läpäisyelektronimikroskoopilla kuvattuna. Paneeli A on tiheysgradientin fraktiosta 7 ja paneeli B fraktiosta 6. Kuvasta nähdään, että näytteessä on ulosteperäisiä vesikkeleitä. Kuvassa B näkyy vesikkelin kalvorakenne (merkitty punaisella nuolella). Oletettujen vesikkeleiden halkaisija on kuvista arvioituna noin 100–200 nm.

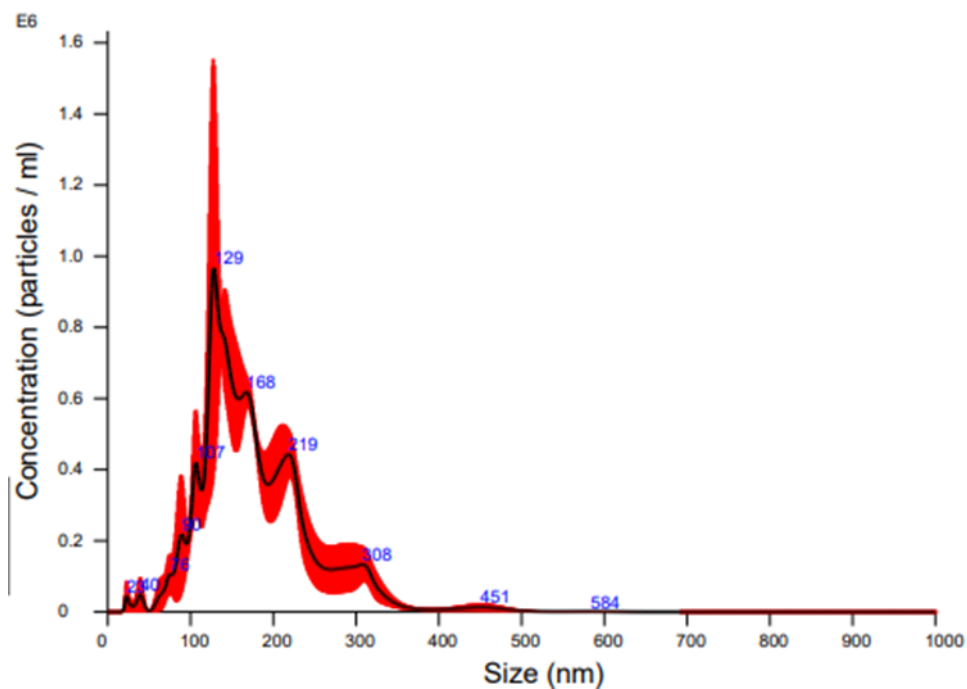


Kuva 8.2. Neljäs kontrollinäyte NTA-analysoituna. Kuvan perusteella partikkeleiden halkaisija on välillä 125–922 nm. Yli 445 nm halkaisijaltaan olevia on vähemmän verrattuna muihin ja 125 nm halkaisijaltaan olevia muita enemmän, niiden konsentraation ollessa noin $0.9E+07$ partikkelia per ml.

Kuvassa 9.1 esitetyn ensimmäisen JIA-näytteen vesikkelin halkaisija on kuvassa A noin 20 nm ja kuvassa B noin 100 nm. Kuvissa näkyy vain yksittäiset vesikkelit sekä epäpuhtautta. Kuvassa 9.2 NTA-analyysin perusteella pienimmät partikkelit ovat noin 20 nm ja suurimmat yli 500 nm. Kuvan 9.2 tuloksesta Nanosight-mittaus ilmoitti tuloksen olevan epäluotettava.

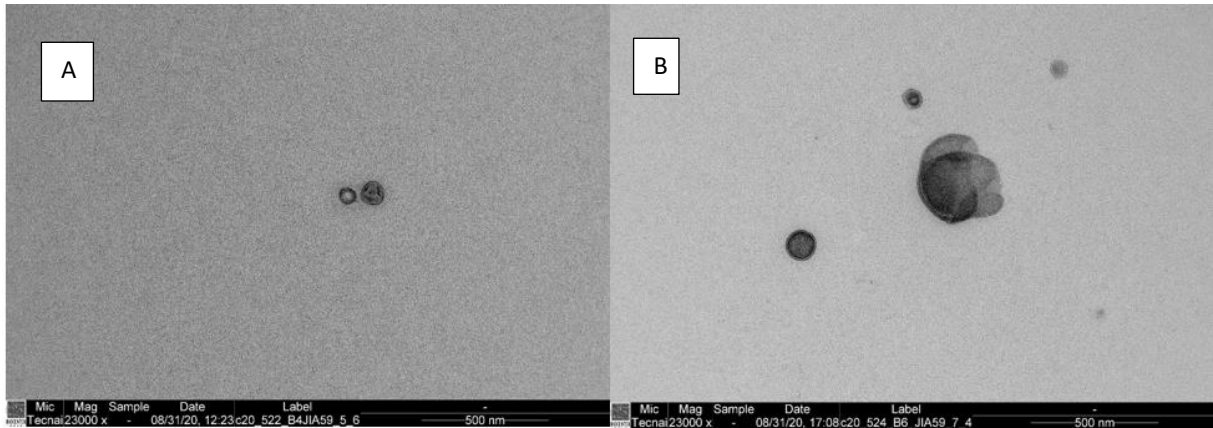


Kuva 9.1. Ensimmäinen JIA-näyte läpäisyelektronimikroskoopilla kuvattuna. Paneeli A on tiheysgradientin fraktiosta 5 ja paneeli B fraktiosta 7. Kuvissa näkyy yksittäiset ulosteperäiset vesikkelit, sekä mahdollinen epäpuhtaus. Paneelin A vesikkeli on noin 20 nm halkaisijaltaan ja paneelin B noin 100 nm halkaisijaltaan.

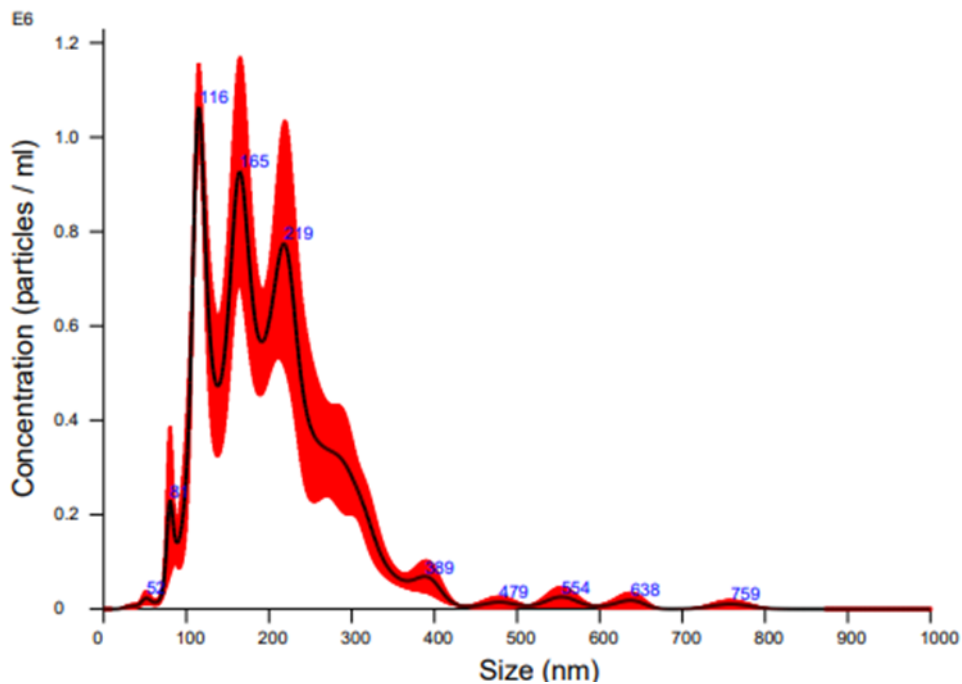


Kuva 9.2. Ensimmäinen JIA-näyte NTA-analysoituna. Kuvan perusteella partikkeleiden halkaisija on välillä 23–584 nm. Yli 308 nm halkaisijaltaan olevia on vähän suhteessa muihin. Eniten partikkeleita on välillä 107–219 nm, niiden konsentraation olessa välillä $0.4E+06$ – $0.95E+06$ partikkelia per ml. Kuvassa on myös melko paljon hajontaa. Tätä tulosta Nanosight-laitteisto piti epäluotettavana.

Kuvassa 10.1 näkyy vesikkeleitä halkaisijaltaan 50–400 nm kuvasta arvioituna. Kuvan B vesikkelit näyttävät rikkoutuneelta. Kuvan 10.2 NTA-analyysin perusteella halkaisijat vaihtelevat noin 50 nm yli 700 nm, enimmäistön ollessa noin 100–200 nm.

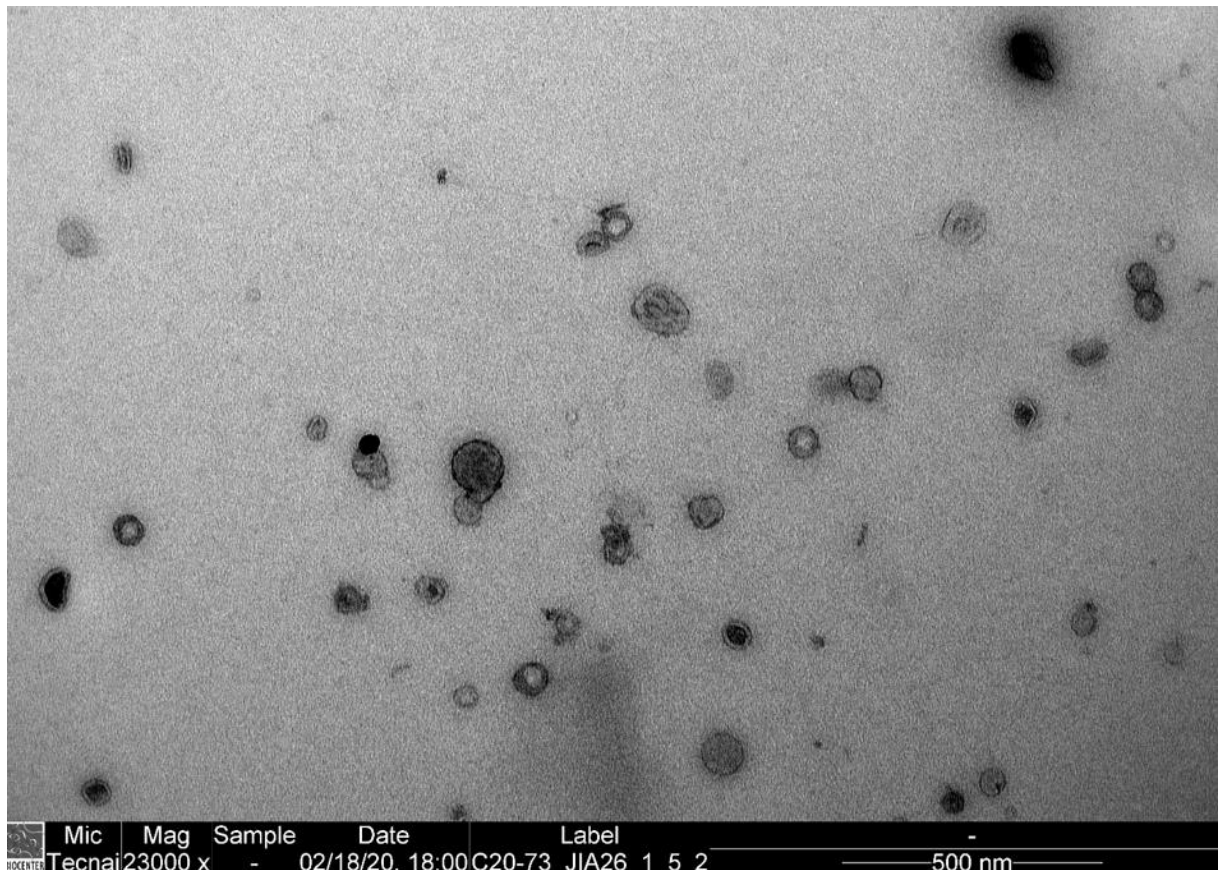


Kuva 10.1. Toinen JIA-näyte läpäisyelektronimikroskoopilla kuvattuna. Paneeli A on tiheysgradientin fraktiosta 5 ja paneeli B fraktiosta 7. Paneelissa A on vähän ulosteperäisiä vesikkeleitä. Paneelissa B on erityisen suuria mahdollisesti rikkoutuneita vesikkeleitä. Kuvassa vesikkeleiden koko vaihtelee, halkaisija ollessa kuvasta arvioituna noin 50–400 nm.

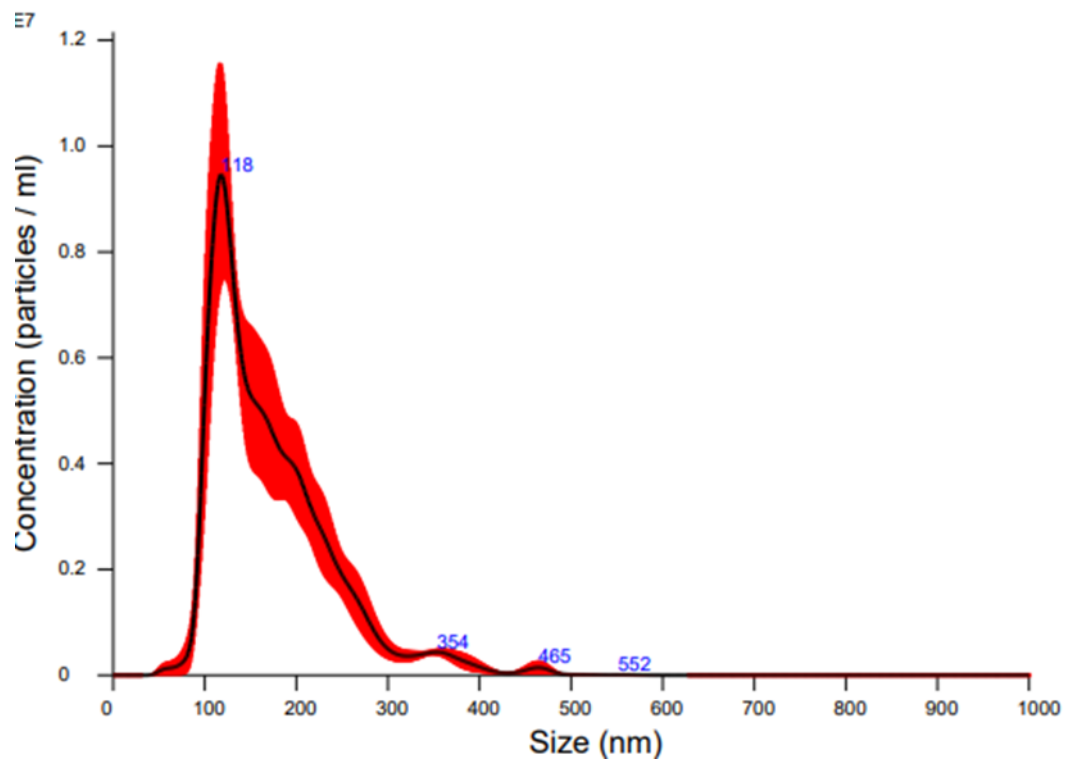


Kuva 10.2. Toinen JIA-näyte NTA-analysoituna. Kuvasta nähdään, että partikkeleiden halkaisija on välillä 52–759 nm, kuitenkin niin, että alle 81 nm ja yli 389 nm halkaisijaltaan olevia on vähän muihin verrattuna. Eniten on halkaisijaltaan 116 nm olevia partikkeleita, joiden konsentraatio on noin 1.05×10^6 partikkelia per ml. Tämän näytteen kohdalla Nanosight-laitteisto varoitti taustamelusta.

Kuvassa 11.1 näyte näytteessä näkyy vesikkeleitä joiden halkaisija on kuvasta arvioituna 50–150 nm. Kuvassa 11.2 NTA-analyysissä arvioituna suurin osa on halkaisijaltaan 100–300 nm.

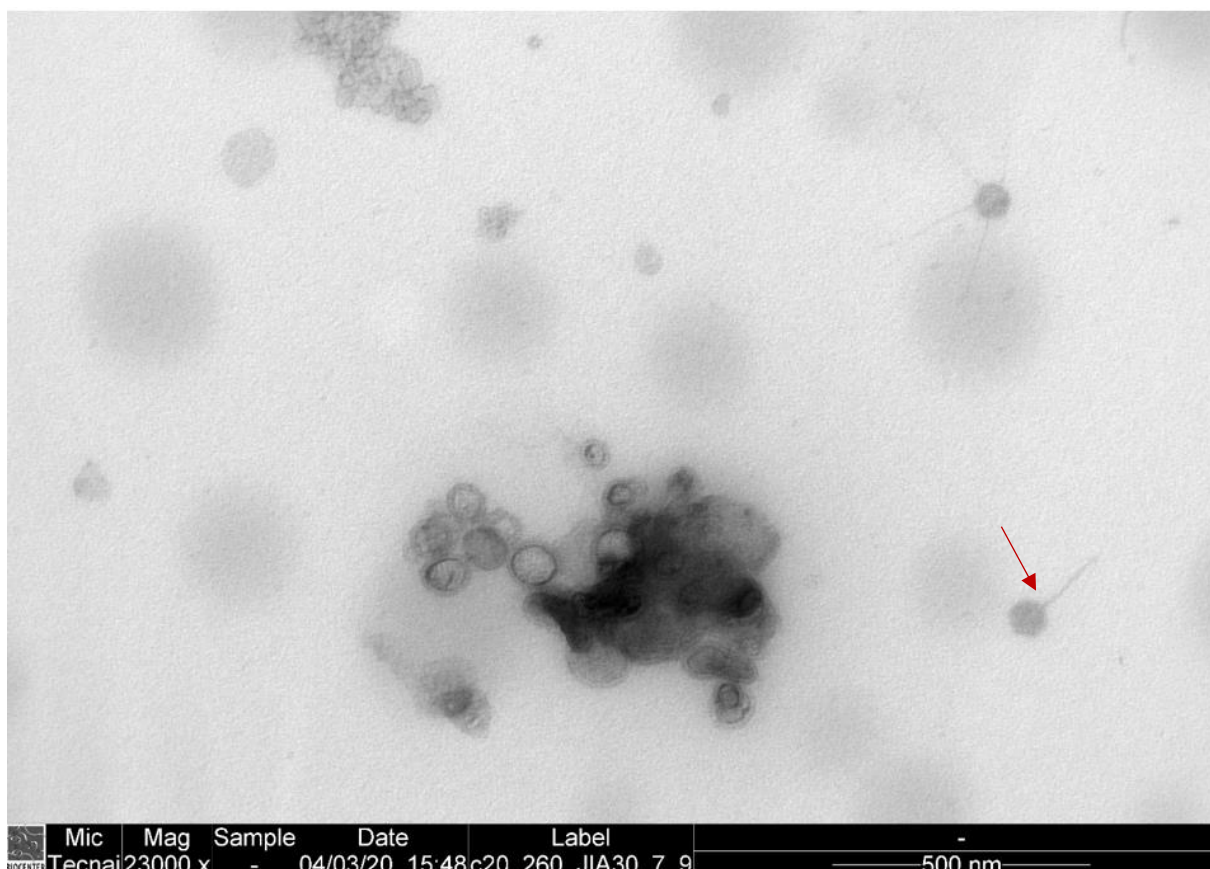


Kuva 11.1. Kolmas JIA-näyte läpäisyelektronimikroskoopilla kuvattuna. Kuva on tiheysgradientin fraktiosta 5. Kuvassa näkyy ulosteperäisiä vesikkeleitä ja eikä näytteessä näy epäpuhtauksia. Kuvasta arvioituna vesikkeleiden halkaisija on noin 50–150 nm.



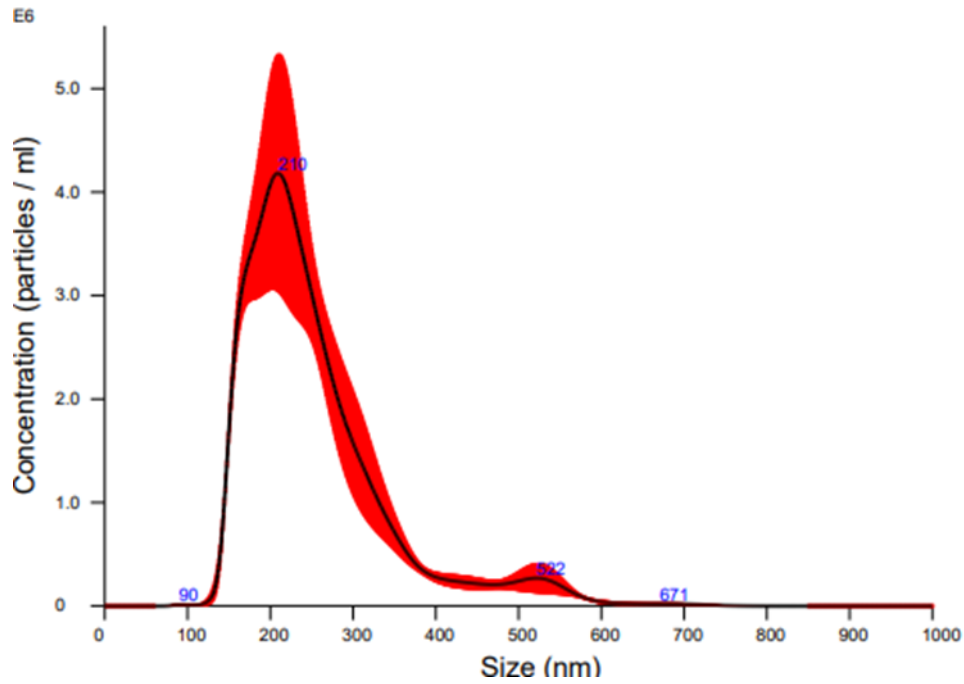
Kuva 11.2. Kolmas JIA-näyte NTA-analysoituna. Kuvan perusteella partikkeleiden halkaisijat ovat välillä 118–552 nm, kuitenkin niin, että suurin osa 118 nm halkaisijaltaan tai hieman yli sen. 118 nm halkaisijaltaan olevien konsentraatio on noin 0.95×10^7 partikkelia per ml.

Kuvassa 12.1 vesikkelit ovat aggregoituneet ja niiden, jotka erottuvat halkaisija on noin 150 nm. Kuvassa 12.2 NTA-analyysissä selvästi eniten on noin 210 nm halkaisijaltaan olevia vesikkeleitä.

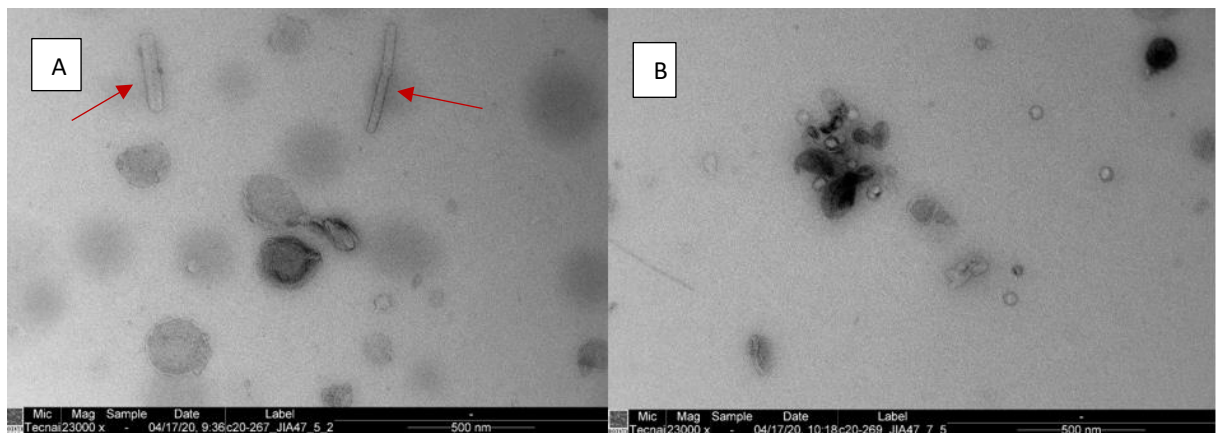


Kuva 12.1. Neljäs JIA-näyte läpäisyelektronimikroskoopilla kuvattuna. Kuva on tiheysgradientin fraktiosta 7. Kuvassa selvästi erottuvien ulosteperäisten vesikkeleiden halkaisija on noin 150 nm. Kuvan vesikkelit ovat aggregoituneet. Kuvassa näkyy mahdollisesti myös bakteriofaagi, joka on merkitty punaisella nuolella.

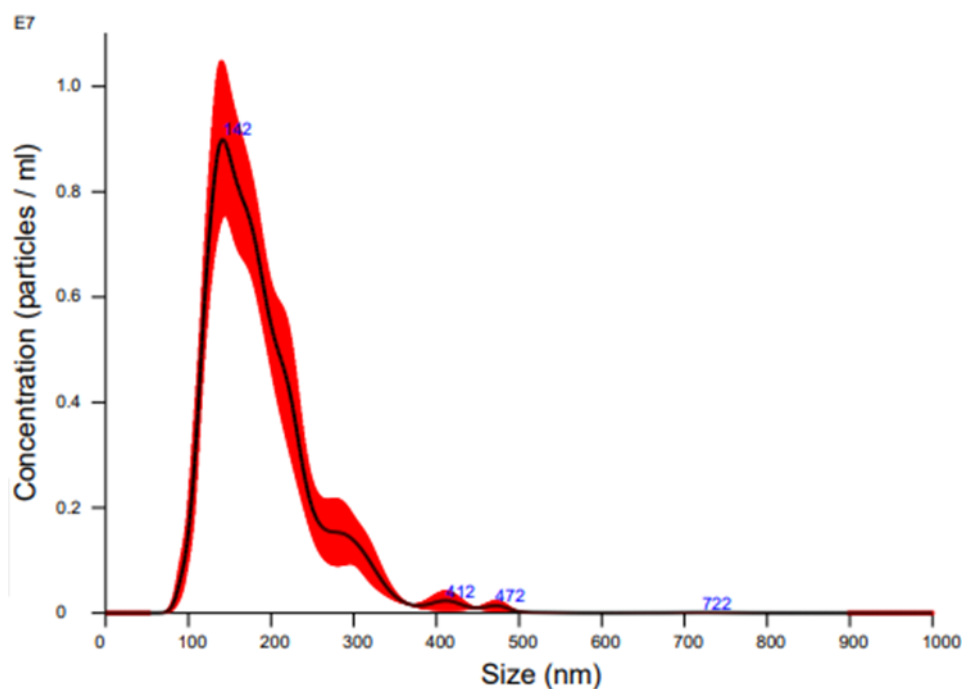
Kuvassa 13.1 näkyy epäpuhtautta. Kuvan 13.1B vesikkelit ovat aggregoituneet. Kuvasta arvioituna vesikkeleiden halkaisija on 50–200 nm. Kuvassa 13.2 NTA-analyysissä selvästi eniten on 142 nm halkaisijaltaan olevia vesikkeleitä ja lähes kaikki ovat välillä 100–400 nm.



Kuva 12.2. Neljäs JIA-näyte NTA-analysoituna. Kuvan perusteella näytteen partikkelien halkaisija on välillä 90–671 nm. Suurin osa on selkeästi noin 210 nm halkaisijaltaan ja niiden konsentraatio on noin $4.3E+06$ partikkelia per ml.



Kuva 13.1. Viides JIA-näyte läpäisyelektronimikroskoopilla kuvattuna. Paneeli A on tiheysgradientin fraktiosta 5 ja paneeli B fraktiosta 7. Kuvassa on eri kokoisia ulosteperäisiä vesikkeleitä. Paneelissa A on tuntematonta epäpuhtautta (merkitty punaisilla nuolilla), paneelissa B vesikkelit ovat aggregoituneet. Kuvassa vesikkeleiden halkaisija vaihtelee noin välillä 50–200 nm.



Kuva 13.2. Viides JIA-näyte NTA-analysoituna. Kuvan perusteella partikkeleiden halkaisija on välillä 142–722 nm. Suurin osa partikkeleista on kuitenkin selvästi noin 142 nm halkaisijaltaan tai hieman sen yli, konsentraation ollessa noin 0.9×10^7 partikkelia per ml.

Elektronimikroskooppikuvien perusteella arvioitu kontrollinäytteiden vesikkeleiden halkaisija oli tyypillisesti noin 100–200 nm. NTA-analyysissä saatu halkaisija on esitetty kuvassa 14B. Kuvan 14B kontrollinäytteiden halkaisijan keskiarvo on suurempi, noin $200 \pm (180\text{--}230)$ nm.

Kuvissa 14D-F alle 10 % kontrollinäytteiden partikkeleista on halkaisijaltaan noin 120–140 nm, alle 50 % on halkaisijaltaan noin 170–215 nm ja alle 90 % on halkaisijaltaan noin 280–345 nm.

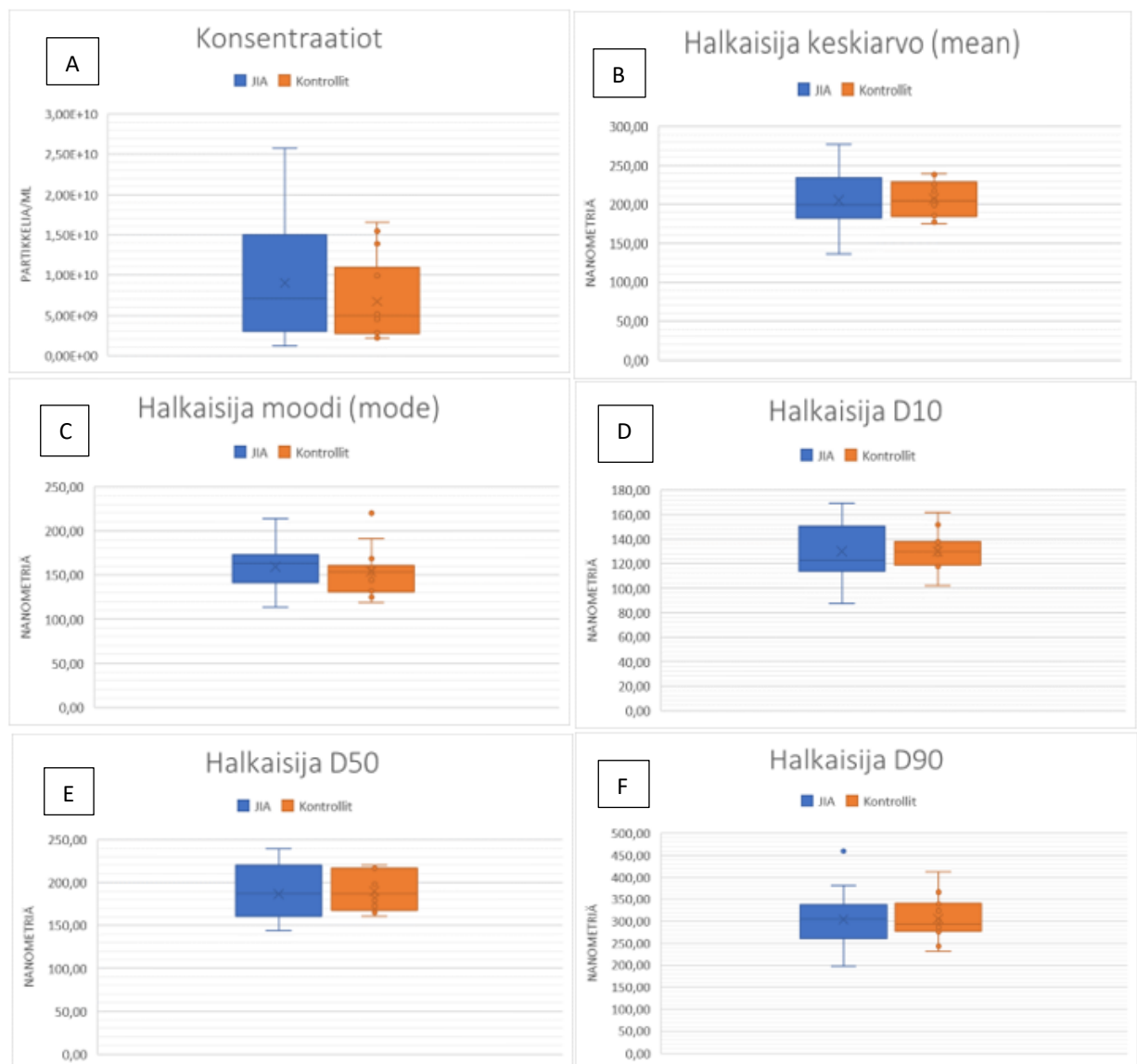
Kuvan 14A perusteella kontrollinäytteiden konsentraation keskiarvo on noin $7.00 \times 10^9 \pm (3.00 \times 10^9\text{--}1.65 \times 10^{10})$ partikkelia per ml.

Kuvissa 14D-F alle 10 % JIA-näytteiden partikkeleista on halkaisijaltaan noin 110–150 nm, alle 50 % on halkaisijaltaan noin 160–220 nm ja alle 90 % on halkaisijaltaan noin 260–340 nm.

JIA näytteissä kuvan 14A partikkeleiden konsentraation keskiarvo on noin $9.00 \times 10^9 \pm (1.00 \times 10^9\text{--}2.30 \times 10^{10})$ partikkelia per ml.

Tilastollisesti verrattiin reumaa sairastavien vesikkeleitä (JIA-näytteet) ja terveiden verrokkien vesikkeleitä (kontrollit) toisiinsa. Molempien ryhmien tilastollisen merkitsevyyden testaamiseen käytettiin Student:n t-testiä ja sitä ennen tarkistettiin varianssi. Varianssi laskettiin, jotta tiedettiin, ettei ryhmien sisällä ole liian suurta hajontaa, joka pitäisi ottaa huomioon ryhmiä verrattaessa. Kaksisuuntainen T-testi tehtiin partikkeleiden konsentraatioille, halkaisijalle (nanometriä) keskiarvo, moodi, D10, D50 ja D90. Ryhmien varianssit eivät poikenneet toisistaan T-testistä saatiin partikkelien konsentraatiolle arvo ($t = 0,3224$, $df = 31$, $P > 0,05$), keskiarvolle arvo ($t = 0,8700$, $df = 31$, $P > 0,05$), moodille arvo ($t = 0,6100$, $df = 31$, $P > 0,05$), D10:lle arvo ($t = 0,9760$, $df = 31$, $P > 0,05$), D50:lle arvo ($t = 0,6973$, $df = 31$, $P > 0,05$) ja D90:lle arvo ($t = 0,9291$, $df = 31$, $P > 0,05$). T-testin perusteella tulokset eivät ole tilastollisesti merkitseviä.

Kuvassa 14 on esitetty diagrammeilla lopulliset keskiarvoihin perustuvat tulokset sekä kontrolleista että JIA-näytteistä niin, että NTA:ssa käytetty laimennus on huomioitu.



Kuva 14. Kontrolli- ja JIA-näytteiden konsentraatiot, halkaisijan keskiarvo, moodi, D10,D50 ja D90. Kuvan kuvaajissa on esitetty JIA-näytteiden ja kontrollien vesikkelikonsentraation keskiarvo yksikössä partikkelia per ml. Seuraavana on vesikkelien halkaisijan keskiarvo nanometreinä. Edelleen vesikkeleiden halkaisijan tyyppiä (moodi) keskiarvo nanometreinä, joka kuvaa lukua, joka esiintyy näytteissä kaikista useimmin. D10 kuvaa keskiarvoa, jonka alle 10 % vesikkeleiden halkaisijoista jää, D50 keskiarvoa, jonka alle 50 % vesikkeleiden halkaisijoista jää ja edelleen D90 keskiarvoa, jonka alle 90 % vesikkeleiden halkaisijoista jää, yksikkö ollessa nanometri.

Proteiinien eristyksen jälkeen ne ajettiin SDS-page-geeliin. Tarkoitus oli saada proteiinit säilöön geeliin. Geeli värjättiin proteiiniin sitoutuvalla väriaineella, jotta UV-valossa voitaisiin nähdä proteiinit ja leikata jokainen näyte erilleen. Väriaine erottui geelillä heikosti ja palat täytyi leikata arvioimalla kohta, johon näyte on mennyt.

Turun yliopiston proteomiikan laitokselta saadussa datassa on löydetty proteiineja, mutta niiden alkuperän ja merkityksen selvittäminen vaatisi erityisosaamista. Alustavasti osa proteiineista on ihmisperäisiä ja osa bakteeriperäisiä.

5. Johtopäätökset

Tutkimuksen tarkoituksena oli saada tuloksia lastenreumaa sairastavien lasten ja terveiden verrokkien ulosteperäisten vesikkeleiden sisältämistä proteiineista. Proteomiikan yksiköstä Turun yliopistosta saadusta datasta ei voi kuitenkaan tehdä luotettavia päätelmiä ja datan käsittely vaatii erityistä osaamista. Maailmanlaajuinen pandemia, Cov-19, pakotti sulkemaan yliopiston tilat keväällä 2020, jolloin tutkimuksen laboratoriotyöskentely oli tarkoitus saada valmiiksi. Muuton vuoksi proteiinien eristys venyi loppuvuoteen 2020 ja tehtiin Helsingin Yliopiston tiloissa. Ainoa henkilö, joka proteiinidataa osaa käsitellä, jäi äitiyslomalle syksyllä 2020, joten tuloksia ei ehditty käsitellä tähän työhön.

Tuloksissa NTA-analyysissä näkyi systemaattisesti suurempia vesikkeleitä kuin elektronimikroskooppikuvissa. Elektronimikroskooppikuvissa suurimmat vesikkelit olivat halkaisijaltaan noin 400 nm, kun NTA-analyysissä mitattiin yli 700 nm. Kuvissa pienimmät vesikkelit olivat halkaisijaltaan noin 10nm, kun NTA-analyysissä mitattiin pienemmillään 20 nm ja alle 100 nm halkaisijaltaan olevia oli suhteessa muihin vähän. Erolle on monta mahdollista syytä. Elektronimikroskooppikuvien perusteella tehty arvio halkaisijasta on silmämääräinen ja voi siten poiketa todellisesta. Arvot ovat pyöristettyjä, koska niitä on vaikeaa tulkita tarkasti. Lisäksi näytteissä on aggregoituneita vesikkeleitä sekä epäpuhtauksia, jotka NTA voi mitata halkaisijaltaan yhtenä suurena partikkelina. Elektronimikroskooppikuvat edustavat aina yhtä kuvaajan valitsemaa kohta näytteestä, vaikka kuvia pyritään valitsemaan mahdollisimman hyvin koko näytettä kuvaavista kohdista. Kuvaaja kiinnittää helposti huomiota poikkeuksellisiin kohtiin näytteessä, mikä voi korostua tuloksissa. Lisäksi vesikkelit jakautuvat kuvattavalle hilalle epätasaisesti. NTA-analyysin luotettavuutta lisää se, että Nanosight-laite tekee aina useamman perättäisen mittauksen.

Tulosten perusteella elektronimikroskooppikuvat ovat hyvä apu arvioitaessa näytteen vesikkeleiden määrää ja näytteen puhtautta ennen seuraavia vaiheita. Ne voivat auttaa arvioimaan NTA-analyysin tuloksen luotettavuutta, koska NTA:n mittaamat suuren halkaisijan partikkelit (yli 700 nm) eivät todennäköisesti ole vesikkeleitä vaan joko usean vesikkelin

muodostamia kerääntymiä tai näytteen epäpuhtauksia. Tulkens:n ym. tutkimuksen perusteella fraktio 5 sisältää pääasiassa ihmisperäisiä vesikkeleitä ja fraktiot 6–7 pääasiassa bakteeriperäisiä vesikkeleitä (Tulkens ym., 2020). Tässä tutkimuksessa silmämääräisesti arvioituna fraktioiden välillä ei ollut selvää eroa ja NTA-analyysiä varten fraktiot on yhdistetty, mikäli ne ovat vain täyttäneet aiemmin mainitut riittävän puhtaan näytteen kriteerit. Kim ym., mukaan gram-negatiivisten bakteerien vesikkelit olisivat tyypillisesti muodoltaan hieman litistyneitä ja noin 20–200 nm halkaisijaltaan, kun taas gram-positiivisten bakteerien vesikkelit säilyttäisivät pyöreän muodon ja olisivat halkaisijaltaan hieman pienempiä, noin 20–100 nm (Kim ym., 2015). Tulosten perusteella elektronimikroskooppikuvista ja NTA-analyysistä ei voi tehdä luotettavia päätelmiä vesikkeleiden alkuperästä, koska tulokset eivät ole riittävän tarkkoja. Tulokset ovat suuntaa antavia ja apuna muiden tulosten tulkinnassa, mutta eivät yksin luotettavia. Kuvasta tehdyt silmämääräiset arviot ovat aina epätarkkoja ja NTA-analyysin mittaamat partikkelit eivät varmuudella ole vesikkeleitä. Sitten on tullut teknologiaa, joka mahdollistaa partikkeleiden halkaisijan mittaamisen tarkemmin kuvausohjelmalla, jolloin kuvista voidaan arvioida halkaisija luotettavammin.

Pandemia viivästytti tutkimusta ja osa vesikkeleistä odotti jopa vuoden + 4 °C:ssä NTA-analyysiä ja kaikki näytteet proteiinin eristystä. Siitä huolimatta ainakin osa vesikkeleistä oli säilynyt ja näytteistä pystyttiin tunnistamaan proteiineja. Ei voida olla varmoja, onko osa tuhoutunut, mutta voidaan todeta, että ainakin osa säilyy verrattaen hyvin.

Tutkimusta voisi jatkaa analysoimalla proteiinien sekvenssidata. Tällöin olisi mahdollista havaita esimerkiksi eroja terveiden ja sairaiden mikrobiperäisten vesikkeleiden proteiineissa. Jos proteiineissa olisi eroja, voitaisiin epäillä eroavien proteiinin merkitystä sairaudelle ja selvittää, johtuvatko proteiinimuutokset sairaudesta vai aiheuttavatko ne osaltaan sairastumista. Näytteille tehdään 16S-sekvensointi, jolloin vesikkeleiden alkuperä voidaan luotettavammin tunnistaa ja mahdollisesti havaita eroja terveiden ja sairaiden mikrobikoostumuksessa.

Edelleen voidaan perustellusti olettaa, että elimistön mikrobistolla on merkitystä erityisesti erilaisten tulehduksellisten sairauksien synnyssä. Tiedetään, että mikrobit käyttävät vesikkeleitä viestintään ja voidaan siten olettaa vesikkeleiden olevan yksi tapa, jolla ne vaikuttavat elimistössä (Kim ym., 2015). Aihetta olisi tärkeä tutkia lisää, jotta sairauksien syntymekanismit voitaisiin ymmärtää ja hyödyntää mikrobeja sekä vesikkeleitä niin diagnostiikassa kuin sairauksien hoidossa. Olisi merkittävää oppia tunnistamaan terveen ihmisen mikrobiomi ja sen vesikkelistö sekä niiden mahdolliset erot esimerkiksi erilaisissa ympäristöissä elävillä. Tutkimus on kuitenkin haastavaa ja tieto on vielä verrattain uutta.

6. Kiitokset

Tämä tutkimus toteutettiin Oulun Biocenter:n tiloissa Reunasen tutkimusryhmässä. Proteiinieristys tehtiin Helsingin yliopistolla, Per Saris:n ryhmässä.

Haluan kiittää ohjaajiani Justus Reunasta ja Lumi Viljakaista. Lisäksi kiitän Per Sarista siitä, että sain hyödyntää hänen ryhmänsä tiloja. Kiitän myös Reunasen tutkimusryhmän Sonja Salmea sekä Jenni Hekkalaa käytännön työssä auttamisesta.

7. Viitteet

References

- Arntz, O. J., Pieters, B. C. H., Oliveira, M. C., Broeren, M. G. A., Bennink, M. B., De Vries, M., . . . Van de Loo, F. A. J. (2015). Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(9), 1701-1712. doi:10.1002/mnfr.201500222
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2020). Gut microbiota: A missing link in psychiatry. *World Psychiatry*, 19(1), 111-112. doi:10.1002/wps.20726
- Fernando, M. M. A., Stevens, C. R., Walsh, E. C., De Jager, P. L., Goyette, P., Plenge, R. M., . . . Rioux, J. D. (2008). Defining the role of the MHC in autoimmunity: A review and pooled analysis. *PLoS Genetics*, 4(4) doi:10.1371/journal.pgen.1000024
- Goulielmos, G. N., Chiaroni-Clarke, R. C., Dimopoulou, D. G., Zervou, M. I., Trachana, M., Pratsidou-Gertsis, P., . . . Ellis, J. A. (2016). Association of juvenile idiopathic arthritis with PTPN22 rs2476601 is specific to females in a greek population. *Pediatric Rheumatology*, 14(1) doi:10.1186/S12969-016-0087-3

- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: From biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*, 19(1) doi:10.1186/s12964-021-00730-1
- Hammaker, D., & Firestein, G. S. (2018). Epigenetics of inflammatory arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 30(2), 188-196. doi:10.1097/BOR.0000000000000471
- Hao, X., Shang, X., Liu, J., Chi, R., Zhang, J., & Xu, T. (2021). The gut microbiota in osteoarthritis: Where do we stand and what can we do? *Arthritis Research and Therapy*, 23(1) doi:10.1186/s13075-021-02427-9
- Hufnagl, K., Pali-Schöll, I., Roth-Walter, F., & Jensen-Jarolim, E. (2020). Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. *Seminars in Immunopathology*, 42(1), 75-93. doi:10.1007/s00281-019-00775-y
- Jalanko Hannu. (2019). Nivelreuma lapsella. Retrieved from <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00950> luettu 21.5.2021
- Janzon, A., Goodrich, J. K., Koren, O., Waters, J. L., Ley, R. E., & TEDDY Study Group. (2019). Interactions between the gut microbiome and mucosal immunoglobulins A, M, and G in the developing infant gut. *mSystems*, 4(6) doi:10.1128/mSystems.00612-19
- Jarvis, J. N., Petty, H. R., Tang, Y., Frank, M. B., Tessier, P. A., Dozmorov, I., . . . Centola, M. (2006). Evidence for chronic, peripheral activation of neutrophils in polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 8(5) doi:10.1186/ar2048
- Kauffmann, F., & Demenais, F. (2012). *Gene-environment interactions in asthma and allergic diseases: Challenges and perspectives* doi://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.10.038
- Kim, J. H., Lee, J., Park, J., & Gho, Y. S. (2015). Gram-negative and gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 40, 97-104. doi:10.1016/j.semcdb.2015.02.006
- Li, Y., Faden, H. S., & Zhu, L. (2020). The response of the gut microbiota to dietary changes in the first two years of life. *Frontiers in Pharmacology*, 11 doi:10.3389/fphar.2020.00334

- Macia, L., Nanan, R., Hosseini-Beheshti, E., & Grau, G. E. (2020). Host-and microbiota-derived extracellular vesicles, immune function, and disease development. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1) doi:10.3390/ijms21010107
- Malin, M., & Markula-Patjas, K. (2020). Lastenreuma. Retrieved from https://www.tays.fi/fi-fi/palvelut/lastentaudit/Lasten_reumasairaudet/Lastenreuma luettu 21.5.2021
- Munir, J., Lee, M., & Ryu, S. (2020). Exosomes in food: Health benefits and clinical relevance in diseases. *Advances in Nutrition*, 11(3), 687-696. doi:10.1093/advances/nmz123
- Prahalad, S., & Glass, D. N. (2008). A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatric Rheumatology*, 6 doi:10.1186/1546-0096-6-11
- Prahalad, S., Ryan, M. H., Shear, E. S., Thompson, S. D., Giannini, E. H., & Glass, D. N. (2000). Juvenile rheumatoid arthritis: Linkage to HLA demonstrated by allele sharing in affected sibpairs. *Arthritis and Rheumatism*, 43(10), 2335-2338. doi:10.1002/1529-0131(200010)43:103.0.CO;2-W
- Rackaityte, E., Halkias, J., Fukui, E. M., Mendoza, V. F., Hayzelden, C., Crawford, E. D., . . . Lynch, S. V. (2020). Viable bacterial colonization is highly limited in the human intestine in utero. *Nature Medicine*, 26(4), 599-607. doi:10.1038/s41591-020-0761-3
- Sehgal, K., & Khanna, S. (2021). Gut microbiome and clostridioides difficile infection: A closer look at the microscopic interface. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 14 doi:10.1177/1756284821994736
- Shehzad, A., Islam, S. U., Shahzad, R., Khan, S., & Lee, Y. S. (2021). Extracellular vesicles in cancer diagnostics and therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics*, 223 doi:10.1016/j.pharmthera.2021.107806
- Sheller-Miller, S., Choi, K., Choi, C., & Menon, R. (2019). Cyclic-recombinase-reporter mouse model to determine exosome communication and function during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 221(5), 502.e1-502.e12. doi:10.1016/j.ajog.2019.06.010

Sultan, A. A., Mallen, C., Muller, S., Hider, S., Scott, I., Helliwell, T., & Hall, L. J. (2019). Antibiotic use and the risk of rheumatoid arthritis: A population-based case-control study. *BMC Medicine*, 17(1) doi:10.1186/s12916-019-1394-6

Toscano, M., De Grandi, R., Stronati, L., De Vecchi, E., & Drago, L. (2017). Effect of lactobacillus rhamnosus HN001 and bifidobacterium longum BB536 on the healthy gut microbiota composition at phyla and species level: A preliminary study. *World Journal of Gastroenterology*, 23(15), 2696-2704. doi:10.3748/wjg.v23.i15.2696

von Mutius, E., & Radon, K. (2008). Living on a farm: Impact on asthma induction and clinical course. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 28(3), 631-647. doi:10.1016/j.iac.2008.03.010